

**Ursprung, Zusammensetzung und  
Transkriptionsaktivität der B-Chromosomen von  
*Brachycome dichromosomatica***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum agriculturarum  
(Dr. rer. agr.)

eingereicht an der

Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.Ing. Sylvia Marschner, geb. Melzer  
geb. am 15.02.1967 in Potsdam-Babelsberg

Präsident  
der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Christoph Markschies

Dekan  
der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät:  
Prof. Dr. Dr. h.c. Otto Kaufmann

Gutachter:  
1. Prof. Dr. Frank Pohlheim  
2. Dr. Andreas Houben

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	B-Chromosomen.....	1
1.1.1	Die B-Chromosomen von <i>Brachycome dichromosomatica</i> .....	5
1.1.1.1	Die B-Chromosomen-lokalisierte 45S rDNA von <i>B. dichromosomatica</i> ...	10
1.2	Der Nukleolus - Ort der chromosomalen rRNA-Synthese .....	12
1.3	Eukaryotische Histonmodifizierungen .....	13
1.4	Die Interphaseorganisation .....	16
<b>2</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
3.1	Pflanzenmaterial und Anzucht.....	19
3.1.1	Die Gattung <i>Brachycome</i> .....	19
3.1.1.1	<i>Brachycome dichromosomatica</i> .....	19
3.1.1.2	<i>Brachycome lineariloba</i> .....	19
3.1.2	Anzucht der Pflanzen.....	20
3.2	Bakterienstamm .....	20
3.3	Vektoren.....	20
3.4	Oligonukleotide für PCR-Amplifikationen .....	20
3.5	Fluoreszenzmarkierter Primer für die ALFexpress-Analyse .....	21
3.6	Genomische DNA-Klone.....	21
3.7	Verbrauchsmaterialien .....	21
3.7.1	Nährmedien und Chemikalien für Bakterien .....	21
3.7.2	Enzyme .....	22
3.7.3	Radioaktiv markierte Verbindungen.....	22
3.8	Molekulare Methoden.....	22
3.8.1	Isolation genomischer DNA .....	22
3.8.2	Mikroisolation von B-Chromosomen .....	22
3.8.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	23
3.8.4	Single-Nucleotid-Polymorphismus (SNP) -Analyse mit dem automatischen Laserfluoreszenz-Express-Sequenzierer .....	24
3.8.5	Klonierung und Sequenzierung .....	24
3.8.6	Radioaktive Markierung von DNA-Proben .....	24
3.8.7	Restriktionsverdau, Southern-Transfer und Southern-Hybridisierung .....	25
3.9	Zytologische Methoden .....	25
3.9.1	Chromosomenpräparation.....	25
3.9.1.1	Quetschpräparation von feulgengefärbten und enzymatisch behandelten Wurzelspitzen .....	25
3.9.1.2	Feulgenfärbung .....	26
3.9.1.3	Enzymbehandlung .....	26
3.9.1.4	Präparate für die indirekte Immunfärbung.....	26

3.9.2	Zellkernsortierung und -präparation .....	26
3.9.3	Silberfärbung der Nukleoli .....	27
3.9.4	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	27
3.9.4.1	Vorbereitung der Präparate .....	27
3.9.4.2	Markierung der DNA-Sonden .....	28
3.9.4.3	Vorbereitung der Probe .....	28
3.9.4.4	Hybridisierung .....	28
3.9.4.5	Posthybridisierungswaschungen .....	28
3.9.4.6	Signaldetektion .....	29
3.9.4.7	Gegenfärbung der Chromosomen .....	29
3.9.5	Kombination von Nukleolus-Silberfärbung und Fluoreszenz- <i>in-situ</i> - Hybridisierung .....	29
3.9.6	Indirekte Immunfluoreszenz-Markierung .....	29
3.9.7	Auswertungssysteme .....	30
3.10	Simulationsmodell .....	30
3.10.1	Statistische Methoden .....	31
3.11	Phylogenetische Methoden .....	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
4.1	Analyse der ITS2-Sequenzen der rDNA von A-, Mikro-B- und Standard-B-Chromosomen des Cytodems A2 .....	33
4.1.1	Wie konserviert ist der ITS2-Sequenz-Polymorphismus der B-Chromosomen? .....	35
4.1.2	Vergleich der ITS2-Sequenzen von <i>B. dichromosomatica</i> mit anderen <i>Brachycome</i> -Arten .....	38
4.2	Bestimmung des potentiellen Transkriptionszustandes von B-Chromosomen-lokalisierten 45S rRNA-Genen .....	41
4.3	Indirekter Nachweis der Transkriptionsaktivität der Mikro-B- Chromosomen .....	43
4.3.1	Anzahl der Nukleoli in 2C- und 4C-Kernen .....	44
4.3.2	Anzahl A-Chromosomen-spezifischer 45S rDNA-Signalkluster .....	46
4.3.3	Anzahl der Assoziationen der A-Chromosomen-spezifischen 45S rDNA mit dem Nukleolus .....	47
4.3.4	Anzahl Mikro-B-Chromosomen-spezifischer Bdm29-Signalkluster mit 45S rDNA-Signalen und ihre Assoziationen mit dem Nukleolus .....	48
4.3.5	Ermittlung der Positionen der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern .....	49
4.4	Vergleichende Analyse der Histonmethylierung von A- und B-Chromosomen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz .....	53
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>58</b>
5.1	Ursprung der 45S rDNA-Sequenzen der B-Chromosomen .....	58
5.1.1	Ursprung B-spezifischer 45S rDNA durch interspezifische Hybridisierung .....	59
5.1.2	Ursprung B-spezifischer 45S rDNA durch Akkumulation von Mutationen .....	63

5.1.3	Erfolgte eine Homogenisierung der A- und B-Chromosomen-lokalisierten ITS2-Sequenzen? .....	65
5.1.4	Phylogenetische Analyse der B-Chromosomen .....	67
5.2	Transkriptionsaktivität der B-Chromosomen .....	68
5.2.1	Vergleich der Histonmethylierungen von A- und B-Chromosomen .....	69
5.2.2	Verhalten und Assoziation der Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus im Interphasekern .....	73
5.2.3	Positionen der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern.....	75
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ac	acetyliert
ALFexpress	Automatischer Laserfluoreszenz-Express-Sequenzierer
bp	Basenpaar
Bs	B-Chromosomen
C	Cytosin
2C	DNA-Gehalt des diploiden, unreplizierten Chromosomensatz
4C	DNA-Gehalt des diploiden, replizierten Chromosomensatz
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
G	Guanin
G1	Zellzyklusphase G1
G2	Zellzyklusphase G2
IPTG	Isopropylthio- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
ITS2	Internal-Transcribed-Spacer 2
K4	Lysin 4
K9	Lysin 9
K20	Lysin 20
K27	Lysin 27
H3	Histon H3
H4	Histon H4
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
mB	Mikro-B-Chromosomen
Mbp	Megabasenpaare
Me	methyliert
me1	monomethyliert
me2	dimethyliert
me3	trimethyliert
nB	Standard-B-Chromosomen
NOR	Nukleolusorganisatorregion
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate-Buffered Saline
rDNA	ribosomale DNA
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RSD-Modell	Random-Spatial-Distribution-Modell
RT-PCR	Reverse-Transcriptase-PCR
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SNP	Single-Nucleotid-Polymorphism
SSC	Standard-Saline-Citrate
T	Thymin
U	Unit
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	<i>Brachycome dichromosomatica</i> .....	5
Abb. 2:	Geografische Verteilung der vier Cytodeme (A1, A2, A3, A4) von <i>B. dichromosomatica</i> (Watanabe et al., 1975). .....	6
Abb. 3:	Karyogramm aller Cytodeme von <i>B. dichromosomatica</i> . (Leach et al., 2004). .....	6
Abb. 4:	Feulgengefärbte Chromosomen von <i>B. dichromosomatica</i> . .....	8
Abb. 5:	Organisation einer 45S rDNA-Einheit. ....	10
Abb. 6:	Positionen der 45S rDNA (rot) auf den Chromosomen von <i>B. dichromosomatica</i> im Cytodem A2.....	12
Abb. 7:	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung von <i>B. dichromosomatica</i> -Chromosomen des Cytodems A2 mit 45S rDNA und DAPI.....	12
Abb. 8:	Darstellung der Histonmodifikationen nach Art und Position der Modifikation (Felsenfeld und Groudine, 2003). ....	14
Abb. 9:	Simulationsmodell, in dem die Objekte (z. B. Nukleoli und mBs) in einem kugelförmigen Kern zufällig verteilt werden. ....	31
Abb. 10:	Vergleich von ITS2-Sequenzen von A-Chromosomen, Standard-B-Chromosomen und Mikro-B-Chromosomen von <i>B. dichromosomatica</i> Cytodem A2 und ITS2-Sequenzen von A-Chromosomen und Standard-B-Chromosomen von <i>B. dichromosomatica</i> Cytodem A1 und von <i>B. lineariloba</i> , Zytotyp C (Donald et al., 1997). ....	35
Abb. 11:	Analyse des <i>SfcI</i> -Verdaus von Klonen der ITS2-PCR von genomischer DNA der Cytodem A1-Probe A1/b ohne B-Chromosomen. ....	38
Abb. 12:	Phylogenetischer Baum von ITS2-Sequenzen, isoliert von verschiedenen <i>Brachycome</i> -Arten, unter Verwendung des Neighbour Joining.....	40
Abb. 13:	Strategie für den molekularbiologischen Nachweis der Transkriptionsaktivität der ITS2- Sequenzen von B-Chromosomen.....	42
Abb. 14:	Sortierung der Interphasezellkerne nach 2C- und 4C-Werten mittels Durchfluss-Zytometrie. Das Histogramm der Fluoreszenz-Intensität (in logarithmischer Darstellung) zeigt die Verteilung der Zellkerne nach DNA-Gehalt.....	44
Abb. 15:	Relative Häufigkeit (%) der Anzahl der Nukleoli in jeweils 300 2C- und 4C-Kernen. ....	45
Abb. 16:	Unterschiedliche Anzahl von Nukleoli nach der Silberfärbung von Zellkernen von <i>B. dichromosomatica</i> . ....	45
Abb. 17:	Relative Häufigkeit (%) von 1, 2, oder 3-4 rDNA Signalklustern der A-Chromsomen in jeweils 300 2C- und 4C-Kernen. ....	46
Abb. 18:	Unterschiedliche Anzahl A-Chromosomen-lokalisierter 45S rDNA-Signale in Zellkernen mit Mikro-B-Chromosomen. ....	47
Abb. 19:	Relative Häufigkeit (%) der Anzahl der Assoziationen der 45S rDNA-Signalkluster der A-Chromosomen mit dem Nukleolus in jeweils 300 2C- und 4C- Kernen. ....	48
Abb. 20:	Relative Häufigkeit (%) der beobachteten und simulierten Assoziationen der Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus in jeweils 300 2C- und 4C-Kernen.....	49
Abb. 21:	Modell der Positionierung der Mikro-B-Chromosomen (mB) im Interphasekern. ....	50
Abb. 22:	Relative Häufigkeit (%) der Mikro-B-Chromosomen in Position 1 und 2 in jeweils 300 2C- und 4C-Kernen.....	51
Abb. 23:	Relative Positionen der Mikro-B-Chromosomen, der 45S rDNA und des Nukleolus im Zellkern.....	52
Abb. 24:	Analyse von chromosomalen Histon-H4K20-Methylierungsmarkierungen. ....	55
Abb. 25:	Vergleichende Analyse von chromosomalen Histon-H3-Methylierungsmarkierungen.....	56
Abb. 26:	Modell zur interspezifischen Hybridisierung als Ursprung B-spezifischer 45S rDNA-Sequenzen. ....	62
Abb. 27:	Modell zur Akkumulation von Mutationen auf den B-Chromosomen von <i>B. dichromosomatica</i> als Ursprung B-spezifischer 45S rDNA-Sequenzen .....	64
Abb. 28:	Vergleich der ITS2-Sequenzen von A-Chromosomen, Standard-B-Chromosomen und Mikro-B-Chromosomen von <i>B. dichromosomatica</i> Cytodem A2 und ITS2-Sequenzen von A-Chromosomen und Standard-B-Chromosomen von <i>B. dichromosomatica</i> Cytodem A1 und von <i>B. lineariloba</i> , Zytotyp C (Donald et al., 1997) (vollständige Sequenzen).....	81

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über die <i>Brachycome</i> -Arten und ihre Akzessionsnummern, die für die phylogenetischen Vergleiche genutzt wurden. (Field et al. 2006). ....	32
Tab. 2:	Ergebnisse der Analyse des <i>Sfc1</i> -Verdaus der ITS2-Fragmente mit dem ALFexpress. ....	37
Tab.3:	Verteilung der methylierten Histon-H3- und Histon-H4-Markierungen in A-Chromosomen, Standard-B-Chromosomen und Mikro-B-Chromosomen. ....	57

# 1 Einleitung

## 1.1 B-Chromosomen

Chromosomen portionieren das Genom und ermöglichen die korrekte Weitergabe der genetischen Information. Während die A-Chromosomen die Standardchromosomen in einem Organismus sind, stellen B-Chromosomen Extrachromosomen zu diesem Standardkomplement dar. B-Chromosomen werden als entbehrliche, überzählige Chromosomen definiert, die nicht mit den A-Chromosomen rekombinieren und ihrem eigenen evolutionären Weg folgen (Beukeboom, 1994).

B-Chromosomen sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet und in ungefähr 260 Tierarten bekannt. 81% dieser Arten sind Insekten (Jones und Rees, 1982). Sie sind vermutlich in 10-15% der Blütenpflanzen vorhanden. Bekannt sind ungefähr 1372 Blütenpflanzen, die B-Chromosomen tragen, davon sind 12 Koniferen und 1360 Bedecktsamer (Jones, 1995). Sie treten gewöhnlich nur in einigen Individuen einer Art auf, während sie in anderen dieser Art komplett abwesend sein können (Jones, 2004). Außerdem kann ihre Anzahl innerhalb und zwischen Individuen variieren. B-Chromosomen können extrem hohe Zahlen in natürlichen Populationen erreichen abhängig vom Grad, wie eine bestimmte Art diese zusätzlichen Elemente tolerieren kann (Camacho et al., 2000). Während in *Zea-mays*-Pflanzen bis zu 34 B-Chromosomen und in *Allium schoenoprasum* bis zu 20 B-Chromosomen gefunden wurden, treten in den Arten *Lolium perenne* nie mehr als drei B-Chromosomen und in *Secale cereale* nicht mehr als acht B-Chromosomen auf (Randolph, 1941; Carter, 1978a; Bougourd und Parker, 1979; Jones und Rees, 1982). Sie unterscheiden sich morphologisch von den A-Chromosomen und sind normalerweise kleiner als die A-Chromosomen. Eine Ausnahme bildet der Fisch *Alburnus alburnus*, dessen B-Chromosom 1,5 mal größer ist als das größte Autosomenpaar (Ziegler et al., 2003).

Der Ursprung der B-Chromosomen ist noch nicht vollständig geklärt, aber es ist wahrscheinlich, dass sie über verschiedene Wege in den unterschiedlichen Organismen entstehen. Eine Möglichkeit besteht darin, dass die B-Chromosomen von den A-Chromosomen abstammen, infolge duplizierter oder fragmentierter Teile innerhalb des Genoms, wie z. B. in der Pflanzenart *Crepis capillaris* (Jamilena et al., 1994) und der Insektenart *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht et al., 1995). Beim Vergleich der Sequenzen der A- und B-Chromosomen von Mais (*Z. mays*) wurde



festgestellt, dass Mais-B-Chromosomen viele Sequenzen besitzen, die von unterschiedlichen A-Chromosomen und auch von polymorphen heterochromatischen A-Chromosomenregionen, so genannten „Knobs“, abstammen (Alfenito und Birchler, 1993; Cheng und Lin, 2003). Es wird angenommen, dass B-Chromosomen in Mais Fusionierungsprodukte von Sequenzen mehrerer A-Chromosomen darstellen, da es keinen Mais-Genotyp oder verwandte Arten gibt, bei denen Knobs neben dem Zentromer der A-Chromosomen liegen, wie es der Fall bei den B-Chromosomen ist (Buckler et al., 1999; Page et al., 2001). In *Brachycome dichromosomatica* gibt es ebenfalls einen evolutionären Zusammenhang zwischen polymorphen und heterochromatischen A-Chromosomenregionen und den B-Chromosomen. Die genomische Organisation des Mikro-B-Chromosoms dieser Art wird als ein Konglomerat aus repetitiven Sequenzen von unterschiedlichen polymorphen A-Chromosomensegmenten betrachtet (Houben et al., 2001b).

Ein anderer Weg für die Evolution der B-Chromosomen wäre ihr Abstammen von Sexchromosomen, wie es für den Frosch *Leiopelma hochstetteri* (Sharbel et al., 1998) postuliert wurde. Eine weitere Möglichkeit ist die spontane Erzeugung von B-Chromosomen als Folge interspezifischer Kreuzungen, wie sie z. B. in Hybriden von *Coix aquaticus* und *C. gigantea* beobachtet wurde (Sapre und Deshpande, 1987).

Da die Anzahl der B-Chromosomen variabel ist, muss die Transmission der Bs in einer nicht-mendelschen Art auftreten. Ihre Akkumulation in Populationen basiert dann auf einer Art Drive-Mechanismus, der vor, während oder nach der Meiose auftreten kann (Jones, 1991). Ein Drive tritt auf, wenn die Chromosomenanzahl in den Keimzellen größer ist als die nach den Mendelschen Gesetzen erwartete Anzahl (z. B.  $> 0,5$ ). In einigen Fällen kann der Drive in der Meiose auftreten, wenn die B-Chromosomen während der ersten Anaphase zu einem Spindelpol wandern und dann bevorzugt in den Kern gehen, der für die spätere Bildung der Eizellen bestimmt ist. Der Drive kann auch in der ersten Pollenkorn-Mitose auftreten, wenn die B-Chromatiden nicht separieren und beide in den generativen Kern gehen. Ein Nichtseparieren (Nondisjunktion) der Bs in der zweiten Pollenkorn-Mitose, gefolgt von einer bevorzugten Befruchtung der Eizelle durch B-Chromosomen enthaltenen Pollen, ist ein anderer Drive-Mechanismus (Jones und Houben, 2003). In Roggen (*Secale cereale*) gibt es ein gerichtetes Nichtseparieren in der ersten Pollenkorn- und Eizellen-Mitose. Dabei werden die nichtseparierten B-Chromatiden nicht den

entgegengesetzten Spindelpolen, sondern demselben Pol zugeteilt. Das führt zu einer unreduzierten Anzahl von B-Chromosomen, die direkt in die Keimzellen gelangen (Jones, 1991; Jones, 2004). In Mais findet das Nichtseparieren in der zweiten Pollenkorn-Mitose statt, der eine bevorzugte Befruchtung von Eizellen durch B-Chromosomen tragende Pollenzellen folgt (Carlson, 1988; Jones, 2004).

B-Chromosomen haben normalerweise keine oder nur sehr schwache phänotypische Effekte (Jones und Rees, 1982). Allgemein geht man davon aus, dass ihre Effekte entweder neutral oder schädlich sind, abhängig von der präsenten Anzahl von B-Chromosomen. In hoher Anzahl reduzieren sie die Fitness und Vitalität (Jones, 2004). In Roggen z. B. hemmen sie die Samenkeimung und das Wachstum umso stärker, je mehr B-Chromosomen vorhanden sind (Müntzig, 1963; Moss, 1966). Zusätzlich haben die B-Chromosomen in Roggen einen starken negativen Effekt auf die Fruchtbarkeit. Je mehr B-Chromosomen vorhanden sind, umso weniger Körner werden ausgebildet. Ab acht B-Chromosomen ist die Pflanze steril (Jones und Rees, 1982).

Ausnahmen sind die B-Chromosomen in *A. schoenoprasum*, die einen nützlichen Effekt auf die Samenkeimung unter Trockenstress haben. Dass heißt, Samen mit B-Chromosomen keimen unter diesen Bedingungen deutlich besser als Samen ohne B-Chromosomen (Holmes und Bougourd, 1989).

B-Chromosomen gelten allgemein als genetisch inaktiv, da keine bedeutenden funktionellen Gene mit phänotypischen Effekten auf den B-Chromosomen bekannt sind. Trotzdem gibt es Beispiele für das Vorhandensein von auf B-Chromosomen lokalisierten Genen. Mit der Lokalisierung von C-KIT Proto-Onkogenen wurden erstmals in den Säugerarten *Vulpe vulpes* und *Nyctereutes procyonoides* autosomale Gene auf B-Chromosomen mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen (Graphodatsky et al., 2005). In der Maus *Apodemus flavicollis* wurden B-Chromosomen mit aktiven Genen nachgewiesen, die für ihre Träger nützlich sein können (Tanic et al., 2005). Dabei handelt es sich um ein Chaperonin (CCT6B), dass eine Rolle in der Reaktion auf Stress und bei der Produktion von Proteinen für ein aktives Zellwachstum spielt. Ein weiteres Gen war das FHIT-Gen, eine Art Tumorsuppressor-Gen. Die Anwesenheit von B-Chromosomen ist assoziiert mit einer veränderten Transkriptionsaktivität dieser Gene (Tanic et al., 2005). Eine große Anzahl verschiedener Pflanzen- und Tierarten besitzen B-Chromosomen, die rDNA enthalten (Green, 1990; Jones, 1995), die aber in den meisten Fällen inaktiv ist

(Lopez-Leon et al., 1999; Stitou et al., 2000; Szczerbal et al., 2005). Kürzlich wurde jedoch für die Pflanzenart *C. capillaris* der erste direkte molekulare Beweis in einer Pflanzenspezies erbracht, dass die B-Chromosomen-lokalisierte 45S rDNA transkriptionsaktiv ist (Leach et al., 2005). Bei der parasitären Wespe *Trichogramma kaykai* wurde ebenfalls bei einem Teil der B-Chromosomen-spezifischen rDNA Transkriptionsaktivität nachgewiesen. Dabei handelte es sich um die rDNA-Sequenzen, die auch sequenzidentisch auf den A-Chromosomen lokalisiert sind (van Vught, 2005).

Die DNA-Sequenzkomposition der B-Chromosomen unterscheidet sich kaum von der der A-Chromosomen. Die meisten B-Chromosomen besitzen repetitive DNA, die den Sequenzen auf den entsprechenden Standardchromosomen ähnelt oder B-spezifisch ist. Timmis et al. (1975) verglichen die DNA von Roggenpflanzen ohne B-Chromosomen mit der von Pflanzen mit bis zu sechs B-Chromosomen. Der Vergleich zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der DNA der A- und B-Chromosomen. Später wurden die Roggen-B-spezifischen repetitiven Sequenzfamilien D1100 (Sandery et al., 1990) und E3900 (Blunden et al., 1993) identifiziert.

Mais-B-Chromosomen besitzen viele hochrepetitive Sequenzen, die sie mit den A-Chromosomen gemeinsam haben. Eine B-spezifische Sequenz (pZmBs), die über das gesamte Mais-B-Chromosomenzentromer verteilt ist, wurde von Alfenito und Birchler (1993) entdeckt. Eine zweite B-spezifische Sequenz wurde von Stark et al. (1996) identifiziert. Diese Sequenz ist mit der Prem-1-Familie der Mais-Retroelemente verwandt.

In *C. capillaris* haben die B-Chromosomen ebenfalls viele DNA-Sequenzen gemeinsam mit den A-Chromosomen. *In-situ*-Hybridisierungen zeigten die Präsenz von rDNA an beiden Enden der B-Chromosomen (Maluszynska und Schweizer, 1989), deren Transkriptionsaktivität in Blättern und Blütenknospengewebe mit Hilfe der RT-PCR von Leach et al. (2005) nachgewiesen wurde. Außerdem wurden Sequenzen, die den Telomersequenzen von *Arabidopsis thaliana* ähnlich sind, detektiert (Jamilena et al., 1994).

Wenig ist über die Chromatinzusammensetzung der B-Chromosomen bekannt. In Pflanzen hat eine frühere Studie gezeigt, dass etwa die Hälfte der B-Chromosomen in Pflanzenarten, die sie besitzen, als heterochromatisch beschrieben werden (Jones, 1975). Heterochromatinreiche B-Chromosomen wurden auch in der

Wanderheuschrecke *Chortiocetes terminifera* (Webb, 1976) und bei *Alburnus alburnus* (Ziegler et al., 2003) mit Hilfe der Giemsa-Bandierung detektiert. Die umfangreichsten Studien wurden an Roggen durchgeführt. Diese zeigten, dass Roggen-B-Chromosomen sowohl Heterochromatin als auch Euchromatin besitzen und ihr Bandierungsmuster sich nicht von dem der A-Chromosomen unterscheidet (Jones und Puertas, 1993). Giemsa-Bandierungen an *B. dichromosomatica*-Chromosomen markierten einen ähnlichen Gehalt an Heterochromatin in Standard-B- und A-Chromosomen, während sich die Mikro-B-Chromosomen als stark heterochromatisch erwiesen (Houben et al., 1997a). Euchromatinreiche B-Chromosomen findet man bei *Scilla vvedenskyi* (Greilhuber und Speta, 1976) und *A. flavicollis* (Tanic et al., 2005).

### 1.1.1 Die B-Chromosomen von *Brachycome dichromosomatica*

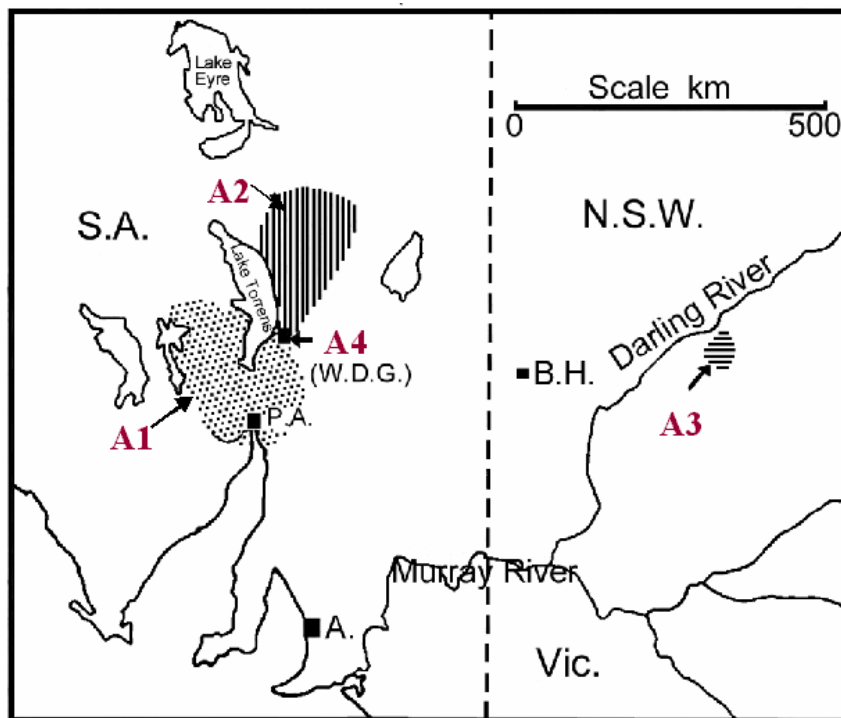
Die *Asteraceae* *Brachycome dichromosomatica* (Synonym *Brachyscome dichromosomatica*) (Abb.1) ist eine einjährige Pflanze mit nur zwei Paar A-Chromosomen, die sich durch eine extrem hohe Genomplastizität auszeichnet.



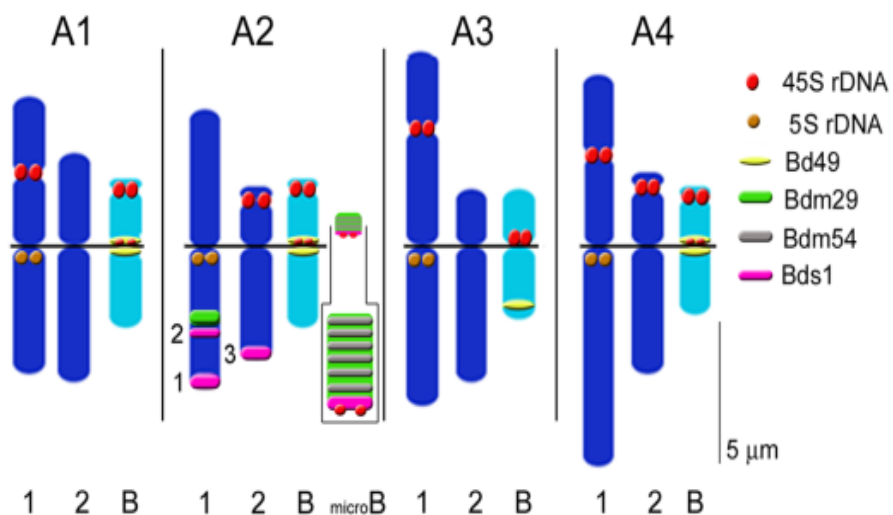
**Abb. 1:** *Brachycome dichromosomatica*.

Diese Art hat vier unterschiedliche Cytodeme (A1, A2, A3, A4), die sich im Karyotyp und in der geografischen Verbreitung unterscheiden (Watanabe et al., 1975). Die Cytodeme A1, A2 und A4 wurden zusammen in benachbarten ariden Regionen Südaustraliens aufgefunden, während Cytodem A3 in einer Region 1000 km östlich entfernt davon zu finden ist (Abb. 2). Die vier Cytodeme unterscheiden sich außerdem in der Anzahl der Positionen der 45S rDNA-Sequenzen

(Abb. 3). Die meisten Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit Pflanzen des Cytodems A2 durchgeführt.



**Abb. 2:** Geografische Verteilung der vier Cytodeme (A1, A2, A3, A4) von *B. dichromosomatica* (Watanabe et al., 1975).

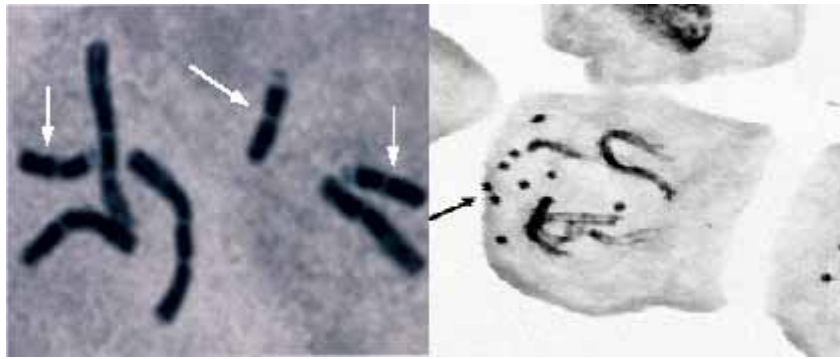


**Abb. 3:** Karyogramm aller Cytodeme von *B. dichromosomatica*. Die Verteilung der spezifischen Sequenzen Bdm29, Bd49, Bdm54, Bds1 und 45S rDNA ist farblich dargestellt (Leach et al., 2004).

Zusätzlich zu den A-Chromosomen des Standardkomplements des Cytodems A2 wurden zwei Typen von B-Chromosomen gefunden. Diese B-Chromosomen sind die mit am umfangreichsten untersuchten B-Chromosomen in höheren Pflanzen (Leach et al., 2004).

Der erste Typ sind die mitotisch stabilen, aber meiotisch irregulären Standard-B-Chromosomen (Abb. 4). Die Standard-B-Chromosomen besitzen einen Akkumulationsmechanismus, der in dem Nichtseparieren (Nondisjunktion) der B-Chromatiden in der ersten Pollenkorn-Mitose und der anschließenden gerichteten Verteilung beider Chromatiden zum generativen Kern besteht (Carter und Smith-White, 1972; Leach et al., 2004). Frühere Untersuchungen ergaben, dass zwölf Prozent von 452 Pflanzen bis zu drei Standard-B-Chromosomen enthielten (Carter und Smith-White, 1972). Diese B-Chromosomen, die eine Länge von etwa 4  $\mu\text{m}$  haben, sind in allen Cytodemen von *B. dichromosomatica* zu finden (Carter, 1978a). Sie haben keinen beobachtbaren phänotypischen Effekt und weisen basierend auf der Giemsa-Bandierung einen ähnlichen Gehalt an Heterochromatin wie die A-Chromosomen auf. Analysen des DNA-Replikationsverhaltens demonstrierten, dass die Standard-B-Chromosomen im Vergleich zu den A-Chromosomen erst spät in der S-Phase replizieren (Houben et al., 1997a).

Die punktförmigen, stark heterochromatischen Mikro-B-Chromosomen stellen den zweiten Typ zusätzlicher Chromosomen dar. Sie wurden in 3,8% der Pflanzen gefunden, sind etwa 1  $\mu\text{m}$  lang und kommen nur in den Cytodemen A1 und A2 vor (Carter, 1978a) (Abb. 4). Im Gegensatz zu den Standard-B-Chromosomen sind sie sowohl mitotisch als auch meiotisch instabil (Carter und Smith-White, 1972). Die beobachtete Variabilität der Anzahl der Mikro-B-Chromosomen innerhalb der Pflanzen wird durch das Nichtseparieren der Schwesterchromatiden während der mitotischen Anaphase verursacht (Houben et al., 2001b).



**Abb. 4:** Feulgengefärbte Chromosomen von *B. dichromosomatica*. Standard-B-Chromosomen gekennzeichnet durch weiße Pfeile. Mikro-B-Chromosomen gekennzeichnet durch schwarzen Pfeil.

Cytodem A2 besitzt außerdem zwei unterschiedliche polymorphe heterochromatische Segmente auf den A-Chromosomen, die entsprechend ihrer repetitiven Sequenzen Bds1-positives und Bdm29-positives polymorphes A-Chromosomensegment genannt werden. Polymorphe Segmente wurden in verschiedenen Pflanzen- und Tierarten gefunden. Sie werden analog zu den überzähligen B-Chromosomen überzählige Segmente genannt, weil sie gemeinsame Eigenschaften teilen: Beide sind entbehrlich und oft heterochromatisch.

Bds1-positive polymorphe A-Chromosomensegmente wurden in 48% von Pflanzen des Cytodems A2 gefunden und sind an bis zu drei unterschiedlichen polymorphen Orten der A-Chromosomen präsent (Houben et al., 2000). Eine einzelne Bds1-Wiederholungseinheit ist 92 bp lang und tandemartig organisiert. Zusätzlich existieren Bds1-Sequenzen auf den Mikro-B-Chromosomen, während sie auf den Standard-B-Chromosomen nicht detektierbar sind (Abb. 3).

Im Gegensatz dazu ist das Bdm29-positive polymorphe A-Chromosomensegment seltener und kommt nur in 3% von Pflanzen des Cytodems A2 vor. Das methylierte Tandem-Repeat ist 290 bp lang und befindet sich nur in einer polymorphen Region des A-Chromosoms 1 (Houben et al., 1997b; Houben et al., 2001b). Es ist Hauptbestandteil der Mikro-B-Chromosomen, wurde aber auch auf den Standard-B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* und anderen B-Chromosomen innerhalb der Gattung *Brachycome* nachgewiesen (Houben et al., 1997b). Das bedeutet eine hohe Konservierung und einen frühen evolutionären Ursprung dieses Tandem-Repeats. Auf den Mikro-B-Chromosomen befinden sich außerdem

neben einer weiteren Tandem-Repeat-Sequenz, die Bdm54 genannt wird, 45S rDNA, Telomersequenzen und andere unidentifizierte Sequenzen (Houben et al., 2001b).

Es gibt offenbar einen evolutionären Zusammenhang zwischen den polymorphen A-Chromosomenregionen und den Mikro-B-Chromosomen. Es ist unstrittig, dass die Bds1- und Bdm29-Repeats Hauptbestandteile der Mikro-B-Chromosomen sind. Da aber die genomische Organisation der Mikro-B-Chromosomen ein Konglomerat repetitiver Sequenzen aus verschiedenen polymorphen A-Segmenten ist, ist es unwahrscheinlich, dass die Mikro-B-Chromosomen durch einfaches Ausschneiden eines polymorphen A-Chromosomen-Segments entstanden sind. Houben et al. (2001b) postulierten deshalb, dass eine Mikro-B-Chromosomen-Gründersequenz aus den polymorphen A-Chromosomenregionen ausgeschnitten und dann durch Telomersequenzen und anderen von A-Chromosomen entstammenden Sequenzen stabilisiert wurde. Die rapide Akkumulation von anderen Sequenzen auf ein *de-novo*-Mikro-B-Chromosom könnte die Kompetenz zur meiotischen Paarung zwischen den angestammten und den abgeleiteten Segmenten reduzieren, so dass das neu geformte B-Chromosom erhalten bleibt und seine unabhängige Evolution beginnen kann.

Hinsichtlich der DNA-Organisation setzen sich die Standard-B-Chromosomen aus B-spezifischen DNA-Sequenzen und mit A-Chromosomen gemeinsamen Sequenzen zusammen. Als Standard-B-spezifische Sequenz wurde das Tandem-Repeat Bd49 detektiert (John et al., 1991; Leach et al., 1995). Dabei handelt es sich um eine hoch repetitive Sequenzfamilie, die ungefähr 10% der Standard-B-Chromosomen bildet (Leach et al., 1995). Bd49 befindet sich in hohen Kopienzahlen im B-Chromosomenzentromer der Cytodeme A1, A2 und A4 und am Ende des langen Arms des Standard-B-Chromosoms im Cytodem A3 (Houben et al., 1999). Kopien dieser Sequenz wurden auch in anderen *Brachycome*-Arten mit und ohne B-Chromosomen, z. B. in *B. lineariloba*, *B. breviscapis* und *B. curvicarpa*, gefunden. Einige Kopien von Bd49-ähnlichen Sequenzen existieren auch auf den A-Chromosomen von *B. dichromosomatica*.

Unterschiede der A- und B-Chromosomen hinsichtlich der Transkriptionsaktivität entsprechen unterschiedlichen Graden der Histon-H4-Acetylierung, die von Houben et al. (1997a) untersucht wurde. Es zeigte sich, dass die Standard-B-Chromosomen im Gegensatz zu den A-Chromosomen viel schwächer mit Antikörpern gegen H4Ac5 und H4Ac8 markiert waren. Keine Differenzen wurden bei H4Ac12 und



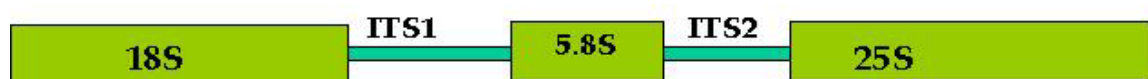
H4Ac16 beobachtet. Interessant wäre, ob auch Unterschiede in den Histonmethylierungen zwischen A- und B-Chromosomen existieren, aus denen sich dann Rückschlüsse auf die Transkriptionsaktivität der B-Chromosomen ziehen lassen könnten.

In *B. dichromosomatica* wurden mit Ausnahme der 45S rDNA auf den Mikro-B-Chromosomen (Houben et al., 1997b) und Standard-B-Chromosomen in allen vier Cytodemen (Donald et al., 1995; Donald et al., 1997; Houben et al., 1999) bisher keine weiteren B-lokalisierten Gene gefunden.

#### 1.1.1.1 Die B-Chromosomen-lokalisierte 45S rDNA von *B. dichromosomatica*

Ribosomale RNA (rRNA) baut zusammen mit verschiedenen Klassen von Proteinkomplexen die Ribosomen auf, die die Translationsfabrik für die Proteinsynthese darstellen (Neves et al., 2005). Ribosomale Gene liegen in Hunderten oder Tausenden (bei Pflanzen) von Wiederholungseinheiten im eukaryotischen Genom vor (Heslop-Harrison, 2000). Entsprechend dem Svedberg-Koeffizienten, werden die rRNAs als 5S, 18S, 5,8S und 25/28S (25S bei Pflanzen und 28S bei Säugern) genannt (Rogers und Bendich, 1987; Schwarzacher und Wachtler, 1993; Pederson und Politz, 2000). Unter rDNA versteht man die DNA, die für die rRNA kodiert. Dabei resultieren die 18S, 5,8S und 25S rRNA aus der 45S rDNA und sind auf den Chromosomen in der NOR lokalisiert, während sich die 5S rRNA-Gene unabhängig von der 45S rDNA an einem oder mehreren Orten auf den Chromosomen befinden.

Zwischen den 18S- und den 5,8S-Abschnitten und den 5,8S- und 25S-Abschnitten liegen sogenannte „internal transcribed spacer“ (ITS1 und ITS2) (Abb. 5) (Appels und Honeycutt, 1986). Im Gegensatz zu den 45S rDNA-Einheiten, die hoch konserviert sind (Walsh und Stephan, 2001), zeigen die ITS-Sequenzen oft ein hohes Niveau an Sequenzvariabilität zwischen eng verwandten Arten und sind somit gut geeignet für phylogenetische Studien (Baldwin, 1992).



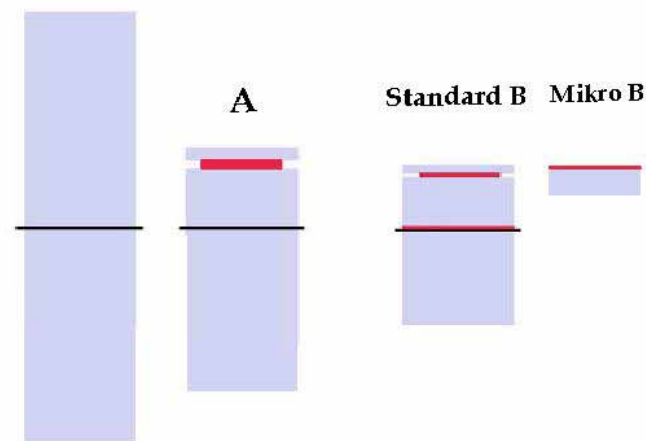
**Abb. 5:** Organisation einer 45S rDNA-Einheit.

Jede Einheit ist in Pflanzen bis zu 10 kb lang (Heslop-Harrison, 2000). Die Organisation einer einzelnen Einheit ist hoch konserviert. Die einzelnen rDNA-Einheiten werden je nach Art durch einen 1 bis über 12 kb langen „intergenomic spacer“ (IGS) unterbrochen (Rogers und Bendich, 1987).

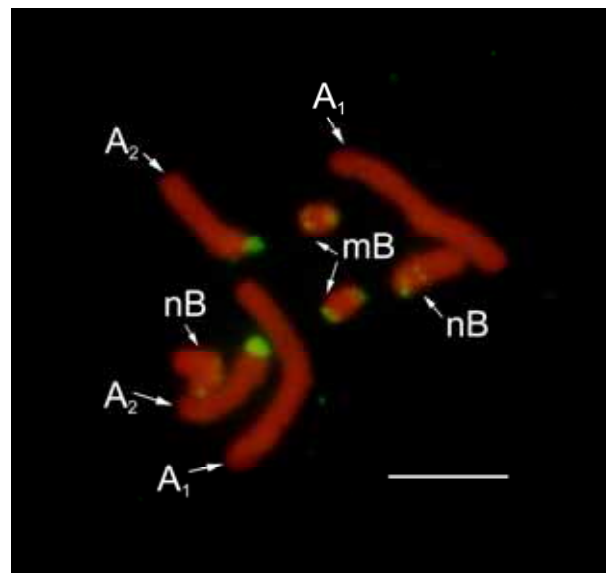
Eine Technik, um rDNA zu detektieren, ist die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), die vielfach geclusterte rDNA-Sequenzen sichtbar macht. Eine weitere Technik stellt die Silberfärbung dar, welche es erlaubt, silberbindende Proteine, die vorher an der Synthese von rRNA beteiligt waren, zu visualisieren (Hubbell, 1985). Die Sichtbarmachung mit Hilfe der Silberfärbung ist daher weitgehend akzeptiert, die Präsenz von aktiven NORs zu zeigen.

*B. dichromosomatica* Cytodem A2 besitzt 45S rDNA am kurzen Arm des A-Chromosoms 2 und des Standard-B-Chromosoms, in geringen Kopienzahlen im Perizentromer des Standard-B-Chromosoms sowie am nichtzentromerischen Ende der Mikro-B-Chromosomen (Houben et al., 1997b) (Abb. 6; 7). Cytodem A1 hat 45S rDNA auf dem A-Chromosom 1 und am Ende des kurzen Arms des Standard-B-Chromosoms (Donald et al., 1995), sowie in geringen Kopienzahlen im Perizentromer des Standard-B-Chromosoms.

Der Vergleich von A- und Standard-B-Chromosomen-lokalisierter 45 S rDNA des Cytodems A1 zeigte zwei beständige Unterschiede zwischen den ITS2-Sequenzen beider Chromosomentypen. Einer von diesen stellte einen einzelnen *Sfi*1-spezifischen Restriktionsort dar, der nur auf den Standard-B-Chromosomen präsent war. RT-PCR-Experimente mit Hilfe von Standard-B-Chromosomen-spezifischen Primern zeigte, dass die 45S rDNA der Standard-B-Chromosomen des Cytodems A1 transkriptionsinaktiv ist (Donald et al., 1997). Es gibt noch keine Informationen über die Sequenzen und die Transkriptionsaktivität der Standard-B- und Mikro-B-Chromosomen lokalisierten 45S rDNA der anderen Cytodeme. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, ob die 45S rDNA der B-Chromosomen auf allen vier Cytodemen sequenzidentisch ist oder Abweichungen voneinander zeigt. Damit könnten Schlüsse auf den Ursprung und die Evolution der B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* gezogen werden.



**Abb. 6:** Positionen der 45S rDNA (rot) auf den Chromosomen von *B. dichromosomatica* im Cytothem A2.



**Abb. 7:** Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von *B. dichromosomatica*-Chromosomen des Cytothems A2 mit 45S rDNA (grün) und DAPI (rot). A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> = A-Chromosomen, mB = Iso-Mikro-B-Chromosomen, nB = Standard-B-Chromosomen.

## 1.2 Der Nukleolus - Ort der chromosomalen rRNA-Synthese

Der Nukleolus, eine große Domäne des Nukleus, ist die Ribosomenfabrik der Zellen (Hernandez-Verdun, 2006). Er ist der Ort der chromosomalen rRNA-Synthese während der Interphase. In ihm ist die rDNA der Nukleolusorganisatorregion (NOR) für die Transkription dekontensiert (Henning,

2002). Ribosomale RNAs werden im Nukleolus mit ribosomalen Proteinen synthetisiert, bearbeitet und montiert. Anschließend werden die ribosomalen Untereinheiten in das Zytoplasma transportiert (Hernandez-Verdun, 2006).

Morphologisch kann man den Nukleolus in drei spezifische strukturelle Hauptkomponenten unterteilen: das fibrilläre Zentrum (FC), die dichte fibrilläre Komponente (DFC) und die granuläre Komponente (GC) (Schwarzacher und Wachtler, 1993).

Betrachtet man die NOR-Chromatinstruktur, so ist ein Teil der rDNA stark kondensiert und dadurch transkriptionsinaktiv. Ein anderer kleinerer Teil ist dekontensiert und transkriptionsaktiv (Carmo-Fonseca et al., 2000). Es wird daher angenommen, dass im Interphasekern dekontensierte rDNA aktive rDNA ist und mit dem Nukleolus assoziiert (Shaw et al., 1996; Pikaard, 2002; Lim et al., 2004; Neves et al., 2005). Inaktive rDNA dagegen assoziiert nicht mit dem Nukleolus (Ochs et al., 1985).

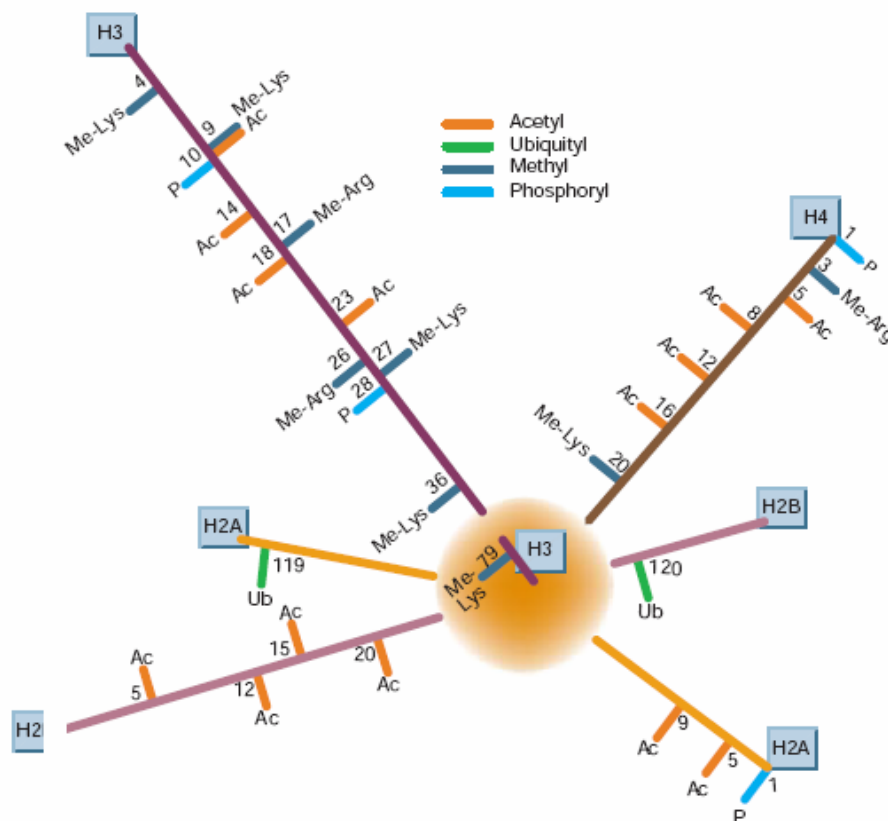
Im *B. dichromosomatica*-Interphasekern lassen sich die Nukleoli gut mit der Silberfärbung detektieren, während die NORs der mitotischen A- und B-Chromosomen mit der Silberfärbung nicht sichtbar gemacht werden konnten (Donald et al., 1997). Obwohl im Cytoplasma A1 Assoziationen der Standard-B-Chromosomen mit dem Nukleolus beobachtet wurden (Donald et al., 1995) zeigte die RT-PCR die Transkriptionsinaktivität der rDNA der Standard-B-Chromosomen in Blattgewebe (Donald et al., 1997). Weitere Studien insbesondere zum Verhalten der A- und B-Chromosomen im Interphasekern hinsichtlich der Assoziation zum Nukleolus sind nötig, um mehr Schlussfolgerungen zur genetischen Aktivität der B-lokalisierten rRNA-Gene ziehen zu können.

### **1.3 Eukaryotische Histonmodifizierungen**

Die genetische Information eines Organismus ist in der DNA kodiert. In Eukaryoten wird die genomische DNA durch die Chromatinstruktur unter Assoziation mit Histonproteinen verpackt. Das Chromatin ist als eine Reihe von Nukleosomen organisiert, die aus 145 bis 147 bp langer DNA, die um ein Histonoktamer gewickelt ist, bestehen. Das Histonoktamer enthält jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 (Kornberg, 1974; Luger et al., 1997). Das Chromatin ist Objekt zahlreicher Veränderungen inklusive der Histonmodifizierung und DNA-

Methylierung. Die Summe dieser biochemischen Veränderungen wird als epigenetische Information bezeichnet (Kubicek und Jenuwein, 2004).

Auf Grund der engen Bindung der Histone mit der DNA wird angenommen, dass diese direkt an DNA-geleiteten Prozessen, wie z. B. der Transkription, Replikation und DNA-Reparatur, beteiligt sind. Histone sind kleine basische Proteine, bestehend aus einer globalen Domäne und einem flexibleren NH<sub>2</sub>-Ende, das aus dem Nukleosom herausragt (Jenuwein und Allis, 2001). Sie sind der Ort zahlreicher Varianten von posttranslationalen Modifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinylierung (van Holde, 1988). Dazu gehören Lysinreste, die acetyliert, methyliert oder ubiquitinyliert werden können; Argininreste, die methyliert sowie Serin- und Threoninreste, die phosphoryliert werden können (Abb. 8).



**Abb. 8:** Darstellung der Histonmodifikationen nach Art und Position der Modifikation (Felsenfeld und Groudine, 2003).

Alle Modifikationen können einander beeinflussen. Zusammen bilden sie in einem bestehenden Stadium des genetischen Materials einen Satz von Markern, welcher „Histonkode“ genannt wird (Strahl und Allis, 2000). Dieser kann das Informationspotential der DNA beträchtlich erweitern (Jenuwein und Allis, 2001). Dabei sind bei aktivem oder inaktivem Chromatin unterschiedliche Modifizierungen an den Aminosäureresten vorhanden. Im Gegensatz zu der universalen Natur des DNA-Kodes unterscheidet sich die „Histonsprache“ und ihr Entschlüsselungsmechanismus teilweise zwischen Pflanzen, Tieren und Pilzen (Loidl, 2004; Fuchs et al., 2006). Die Histon-Lysin-Methylierung bildet dabei durch ihre Auswirkungen z. B. auf die Bildung des Heterochromatins oder bei der X-Chromosomeninaktivierung eine zentrale epigenetische Modifikation für die Organisation des eukaryotischen Chromatins (Lachner und Jenuwein, 2002). Histonmethylierungen treten an den Histonen H3 und H4 auf. Bisher wurden sechs Lysinreste (K4, K9, K27, K36, K79 an H3 und K20 an H4) an diesen Histonen als Orte für die Methylierung lokalisiert. Die einzelnen Lysinseitenketten können mono-, di- oder trimethyliert sein (Martin und Zhang, 2005), was die Möglichkeiten des epigenetischen Kodes noch wesentlich erweitert.

Abhängig vom Methylierungsort kann die Histon-Lysin-Methylierung entweder transkriptionale Aktivität oder Inaktivität signalisieren (Zhang und Reinberg, 2001). Während die Histon-3-Lysin-4-Methylierungen (H3K4me) mit einer Aktivierung der Gene in Verbindung gebracht werden und in Eukaryoten hoch konserviert sind, gelten die Methylierungen an Histon-3-Lysin-9 (H3K9me), Histon-3-Lysin-27 (H3K27me) und Histon-4-Lysin-20 (H4K20me) als variabler (Fuchs et al., 2006) und werden oft mit repressiven Chromatinbereichen in Verbindung gebracht (Fischle et al., 2003). So sind in *Hordeum vulgare* H3K4me<sub>1,2,3</sub>, H3K9me<sub>3</sub> sowie H3K27me<sub>2,3</sub> spezifisch für Euchromatin und H3K9me<sub>1,2</sub>, H3K27me<sub>1</sub> und H4K20me<sub>1</sub> typisch für heterochromatische Bereiche, während in *Vicia faba* nur H3K4me<sub>1,2,3</sub> als euchromatische Marker auftreten und H3K9me<sub>1,2</sub>, H3K27me<sub>1,2,3</sub> und H4K20 als heterochromatische Markierung zu erkennen sind. In *A. thaliana* dagegen ist eine Markierung mit H3K4me<sub>1,2,3</sub>, H3K9me<sub>3</sub>, H3K27me<sub>3</sub> sowie H4K20me<sub>2,3</sub> typisch für das Euchromatin, während heterochromatische Bereiche mit H3K9me<sub>1,2</sub>, H3K27me<sub>1,2</sub> sowie H4K20me<sub>1</sub> angereichert sind (Naumann et al., 2005; Fuchs et al., 2006).

Im Säugerchromatin ist H3K9me3 und H3K27me1 spezifisch für perizentrisches Heterochromatin (Peters et al., 2003). Dagegen sind Mono- und Dimethylierungen von H3K9, alle Methylierungsstadien von H3K27 und die Trimethylierung von H4K20 vorherrschende Marker für das perizentromerische Heterochromatin in *D. melanogaster* (Ebert et al., 2006).

B-Chromosomen werden basierend auf früheren zytologischen Untersuchungen in über der Hälfte der Pflanzenspezies, die B-Chromosomen besitzen, als heterochromatisch beschrieben (Jones, 1995). Histonmethylierungen spielen eine Rolle in der Eu- und Heterochromatinformatierung. Unterschiede in der Histonmethylierung zwischen A- und B-Chromosomen könnten Hinweise für eine unterschiedliche Transkriptionsaktivität der Gene auf den jeweiligen Chromosomen liefern. Vergleiche von H3K4me2 und H3K9me2 zwischen A- und B-Chromosomen in *C. capillaris*, *S. cereale* und *B. dichromosomatica* zeigten eine ähnliche Verteilung der euchromatischen und heterochromatischen Markierungen. Das weist darauf hin, dass das Eu- und Heterochromatin der B-Chromosomen einer ähnlichen Art der Dimethylierung an H3K4 und H3K9 wie die A-Chromosomen unterliegt (Houben et al., 2003).

Im Gegensatz dazu findet man auf den inaktivierten X-Chromosomen in Säugern eine verringerte Methylierung an dem euchromatin-spezifischen H3K4 und eine Erhöhung von H3K9 und H3K27, die als Marker für Heterochromatin und Geninaktivierung gelten (Heard, 2005). Eine ähnliche Situation wurde auf den Sex-Chromosomen von *Rumex acetosa* vorgefunden (Mosiolek et al., 2005).

## 1.4 Die Interphaseorganisation

Eukaryotische Genome sind nicht zufällig innerhalb des Zellkerns organisiert und zeigen eine spezifische funktionelle Architektur (Cockell und Gasser, 1999; Francastel et al., 2000). Chromosomen belegen definierte Domänen im Interphasekern von Pflanzen und Tieren, die Chromosomenterritorien genannt werden (Cremer und Cremer, 2001; Williams, 2003). Die räumliche Organisation des Genoms innerhalb des Zellkerns kann in der Erhaltung des aktiven oder ruhenden Status von Genen eine Rolle spielen (Bridger und Bickmore, 1998). Es wurde gezeigt, dass sich frühreplizierendes Chromatin hauptsächlich im Inneren des Zellkerns befindet, während sich spätreplizierendes Chromatin im gesamten Zellkern

und/ oder am Zellkernrand konzentriert (Ferreira et al., 1997; Sadoni et al., 1999; Mayr et al., 2003). Dabei ist der Replikationszeitpunkt mit funktionalen Charakteristiken der DNA und des Chromatins verbunden. Während frühreplizierendes Chromatin potentiell transkriptionsaktiv ist, ist spätreplizierendes Chromatin oft inaktiv (Schubeler et al., 2002; Mayr et al., 2003). Vergleichende Untersuchungen der funktionellen Genomarchitektur von tierischen und pflanzlichen Zellkernen zeigten eine auffallende Ähnlichkeit in evolutionär entfernten Organismen. Das deutet auf eine evolutionäre Konservierung dieser nuklearen Eigenschaften hin (Mayr et al., 2003). Jedoch ergaben Untersuchungen bei *A. thaliana* eine zufällige Aufteilung der Chromosomenterritorien mit Ausnahme der NOR-tragenden Chromosomen (Pecinka et al., 2004).

Die Standard-B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* replizieren spät in der S-Phase (Houben et al., 1997a), während die Mikro-B-Chromosomen im Verlauf der gesamten S-Phase replizieren (Marschner et al., 2007). Analysen zur räumlichen Verteilung der B-Chromosomen im Interphasekern sind bis jetzt noch nicht durchgeführt worden. Untersuchungen der Positionen der B-Chromosomen im Interphasekern und deren räumliche Beziehung zum Nukleolus könnten weitere Erkenntnisse hinsichtlich ihres Transkriptionsstatus bringen.

## **2 Ziel der Arbeit**

*B. dichromosomatica* ist eine besonders geeignete Spezies, um die Evolution und Transkriptionsaktivität von B-Chromosomen zu analysieren. Sie zeichnet sich neben einer geringen A-Chromosomenzahl ( $2n=4$ ) durch eine extrem hohe Genomplastizität aus. Zusätzlich zu verschiedenen Cytodemen (A1, A2, A3 und A4) existieren zwei B-Chromosomentypen (Standard-B-Chromosomen und Mikro-B-Chromosomen) und polymorphe, aus Satelliten-DNA bestehende, heterochromatische A-Chromosomensegmente (Abb. 3). Die Zusammensetzung dieser fakultativen Genomkomponenten wurde intensiv analysiert (Franks et al., 1996; Houben et al., 1997a; Houben et al., 1997b; Houben et al., 1999; Houben et al., 2000; Houben et al., 2001b). Bis jetzt wurden als einzige Gene die 45S rDNA auf den B-Chromosomen nachgewiesen (Donald et al., 1995; Donald et al., 1997).

Um Aussagen zum Ursprung der B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* treffen zu können, soll die rDNA, speziell die ITS2-Sequenzen, der A- und B-Chromosomen



mit Hilfe der Sequenzanalyse und phylogenetischer Studien verglichen werden. Von großem Interesse ist dabei der Transkriptionszustand der B-lokalisierten rDNA-Sequenzen. Ergeben sich signifikante Sequenzunterschiede, könnte mittels einer RT-PCR der molekulare Beweis des Transkriptionszustandes der rRNA-Gene der B-Chromosomen erbracht werden.

Untersuchungen zur Verteilung der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern könnten indirekte Aussagen über den Transkriptionszustand der Mikro-B-lokalisierten rDNA, möglich machen.

Chromatinveränderungen können den Transkriptionszustand von Genen beeinflussen. Deshalb soll ein Vergleich bestimmter Histonmethylierungen an A-Chromosomen und beiden B-Chromosomen-Typen zeigen, ob es Unterschiede in den Modifikationen zwischen den Chromosomentypen gibt. Dadurch könnten weitere neue Informationen über die Transkriptionsaktivität und Chromatinzusammensetzung der B-Chromosomen gewonnen werden.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Pflanzenmaterial und Anzucht**

##### **3.1.1 Die Gattung *Brachycome***

*Brachycome* ist ein Mitglied der Familie *Compositae* (auch *Asteraceae*) und gehört zum Tribus *Astereae*. Die Gattung *Brachycome* Cass. (Synonym *Brachyscome*) ist einheimisch in der australasiatischen Region, aber überwiegend in Australien zu finden. Diese Gattung umfasst ungefähr 80 Arten mit großer Variation in der geographischen Verbreitung, die klimatische Extreme von Zonen mit hoher Niederschlagsmenge an der Küste und in den Bergen bis zu den halbtrockenen Regionen von Zentralaustralien einbezieht (Davis, 1948; Smith-White und Carter, 1970; Carter, 1978b).

##### **3.1.1.1 *Brachycome dichromosomatica***

*B. dichromosomatica* war früher als *Brachycome lineariloba* Gattung A (Smith-White und Carter, 1970; Carter, 1978c) bekannt und ist eine einjährige Pflanze mit zwei Paar A-Chromosomen ( $2n=4$ ). Die Spezies ist in vier verschiedene Cytodeme unterteilt, genannt A1, A2, A3, A4, die sich im Karyotyp und in der geographischen Verteilung unterscheiden (Watanabe et al., 1975). Zusätzlich zu den Standard-A-Chromosomen wurden zwei Typen von B-Chromosomen gefunden. Die Standard-B-Chromosomen mit einer Länge von 4  $\mu\text{m}$  sind in allen Cytodemen präsent, während die punktförmigen Mikro-B-Chromosomen mit einer Größe von unter 1  $\mu\text{m}$  nur in den Cytodemen A1 und A2 auftreten (Carter und Smith-White, 1972).

##### **3.1.1.2 *Brachycome lineariloba***

*Brachycome lineariloba* ist phänotypisch sehr ähnlich zu *B. dichromosomatica* und wächst oft in Gemeinschaft mit dieser. Es existieren drei Unterarten (B, C, E), die morphologisch nicht unterscheidbar sind, aber sich in der Anzahl der Chromosomen unterscheiden (B:  $2n=12$ , C:  $2n=16$  und E:  $2n=10$ ) (Smith-White und Carter, 1970).

### 3.1.2 Anzucht der Pflanzen

Die Keimung der Achänen bei *B. lineariloba* erfolgte durch Auslegen auf feuchtes Filterpapier in der Feuchtkammer bei ständiger Belüftung bei einer Temperatur von 22°C. Nach entsprechender Größe der Keimblätter und Wurzel wurden die Pflanzen in einzelne Töpfe gepflanzt und im Gewächshaus kultiviert.

Die Anzucht von *B. dichromosomatica*-Achänen gestaltete sich weitaus komplizierter, da die Keimungsrate der Früchte etwa nur 1% in 6 Monaten beträgt (Salkin et al., 1995). Aus diesem Grund wurden die Achänen für mindestens einen Tag in Wasser gequollen und danach die Fruchtsamenhülle und die zwei den Embryo umgebenden Häutchen vom ca. 2 mm großen Keimling mikromanipulativ entfernt. Anschließend erfolgte die Anzucht auf feuchtem Filterpapier in der Feuchtkammer bei 22°C und nach ungefähr 7 bis 10 Tagen das Pflanzen in Töpfe. Zur Erhaltung der Pflanzenlinien wurden die Pflanzen vegetativ geklont. Dazu wurden junge Triebe abgeschnitten, in Bewurzelungspulver (RHIZOPON, Fleur Ami GmbH) getaucht und dann in Anzuchterde (Erde : Sand : roter Torf, 3 : 1,5 : 1) gesteckt. Nach ca. 2 bis 3 Wochen bildeten diese Stecklinge Wurzeln und wurden dann in größere Töpfe umgepflanzt.

### 3.2 Bakterienstamm

*Escherichia coli*: DH5 $\alpha$  (Stratagene)

### 3.3 Vektoren

pBluescript + II (Stratagene)

pGEM-T Easy (Promega)

### 3.4 Oligonukleotide für PCR-Amplifikationen

XF58s (ITS2) for 5'- CTT CTA GAG CCT GGG CGT CAC G - 3'

ER25s (ITS2) rev 5'- CGG AAT TCT GAC CTG GGG TCG C - 3'

ITS2 intern for 5'- CGA CTA GTG GTG GTT GAC - 3'

Bdm29for	5'- GTA TGG AGG CCA TTT ATG G - 3'
Bdm29rev	5'- GCA AAA ACA AGC TTC CCG G - 3'
5S rDNA for	5'- GTG CGA TCA TAC CAG CAC TAA TGC ACC GG - 3'
5S rDNA rev	5'- GAG GTG CAA CAC GAG GAC TTC CCA GGA GG - 3'

### 3.5 Fluoreszenzmarkierter Primer für die ALFexpress-Analyse

XF58s (ITS2)	5'- Cy5 - CTT CTA GAG CCT GGG CGT CAC G - 3'
--------------	--

### 3.6 Genomische DNA-Klone

Bd49 (pBluescript + II)	176 bp langes Standard-B-spezifisches Tandem-Repeat (John et al., 1991)
Bdm29 (pGEM-T Easy)	290 bp langes Mikro-B-spezifisches Tandem-Repeat (Houben et al., 1997b)
45S rDNA	BAC T15P10, <i>A. thaliana</i> (Akzessionsnummer: AF167571)

### 3.7 Verbrauchsmaterialien

#### 3.7.1 Nährmedien und Chemikalien für Bakterien

LB-Medium (flüssig):	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0
LB Agar (fest):	15 g/l Agar in LB Medium
SOC-Medium:	20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl, 250 mM KCl, 1 M MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glukose
Ampicillin:	50 mg/ml
IPTG:	24 mg/ml
X-Gal:	20 mg/ml Dimethylformamid

### 3.7.2 Enzyme

Restriktionsenzyme ( <i>Sfc</i> 1, <i>Hpy</i> CH <sub>4</sub> V, <i>Eco</i> R1)	Fermentas, Biolabs
T4-Ligase	Fermentas
Taq-Polymerase	Quiagen, Biomol
DNA-Marker	Fermentas, Metabion
Lysozym	Boehringer
RNAse	Fermentas

### 3.7.3 Radioaktiv markierte Verbindungen

$\alpha$ - <sup>32</sup> P -dCTP: 370 MBq/ $\mu$ l	Amersham
--	----------

## 3.8 Molekulare Methoden

### 3.8.1 Isolation genomischer DNA

100 – 300 mg gemörstertes Blattmaterial wurde mit 19 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,5% SDS, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert und für 15 min bei RT geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 Volumen Phenol und 0,5 Volumen Chloroform. Danach wurde jeweils für 5 min bei RT geschüttelt und das Gemisch zentrifugiert (10 min, 4°C, 3500 rpm). Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit 2,5 Volumen Ethanol und 0,4 Volumen 5 M Natriumacetat präzipitiert (20 min, RT), anschließend zentrifugiert (15 min, 4°C, 3500 rpm) und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 4°C, 3500 rpm). Die DNA wurde nach Lufttrocknung in 100 - 500  $\mu$ l 1x TE resuspendiert.

### 3.8.2 Mikroisolation von B-Chromosomen

Um spezifische DNA von B-Chromosomen zu erhalten, wurde die Technik der Mikrodisektion, wie bei Houben et al.(2001a) beschrieben, genutzt.

Es wurden 3 - 5 Chromosomen in 1  $\mu$ l Wasser gesammelt und für die ITS2-PCR-Reaktion eingesetzt.

### 3.8.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation definierter Fragmente mit sequenzspezifischen Primern von genomischer DNA zur weiteren Anwendung fand nach folgenden Reaktionsbedingungen und Ansätzen statt:

#### **ITS2:**

##### Reaktionsbedingungen:

2 min Initialdenaturierung bei 95°C, 30 Zyklen mit je 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C, 1 min 72°C durch, gefolgt von einer Finalelongation von 7 min bei 72°C.

##### Ansatz:

50 ng genomische DNA, je 10 µM Primer, 1.0 U *Taq*-DNA-Polymerase, 0,5 mM dNTPs und 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Puffer.

#### **5s rDNA:**

##### Reaktionsbedingungen:

2 min Initialdenaturierung bei 94°C, 30 Zyklen mit je 1 min bei 94°C, 1 min bei 60°C, 1 min 72°C durch, gefolgt von einer Finalelongation von 5 min bei 72°C.

##### Ansatz:

50 ng genomische DNA, je 10 µM Primer, 0,1 U *Taq*-DNA-Polymerase, 0,2 mM dNTPs und 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Puffer, 1x Q-Solution.

#### **Bdm29:**

##### Reaktionsbedingungen:

2 min Initialdenaturierung bei 94°C, 30 Zyklen mit je 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C, 1 min 72°C durch, gefolgt von einer Finalelongation von 5 min bei 72°C.

##### Ansatz:

50 ng genomische DNA, je 10 µM Primer, 0,1 U *Taq*-DNA-Polymerase, 0,1 mM dNTPs und 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x Puffer.

### **3.8.4 Single-Nucleotid-Polymorphismus (SNP) -Analyse mit dem automatischen Laserfluoreszenz-Express-Sequenzierer**

Die PCR-Amplifikation des ITS2-Abschnitts mit einem 5'-fluoreszenzmarkierten Primer wurde mit genomischer DNA von *B. dichromosomatica* mit und ohne Standard-B-Chromosomen der Cytodeme A1 – A4, mit Mikro-B-Chromosomen des Cytodem A2 und mit genomischer DNA von *B. lineariloba* (Zytotyp B, C, E) durchgeführt und anschließend mit *Sfcl* (4 U per 20 µl Reaktion) bei 37°C über Nacht verdaut. Die Fragmentanalyse wurde mit dem automatischen Laserfluoreszenz-Express-Sequenzierer (ALFexpress) (Amersham Biosciences, Freiburg) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Marion Röder (IPK, Gatersleben) durchgeführt. Die Fragmentgrößen wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Fragment-Analyse Version 1.02 (Amersham Biosciences, Freiburg) ermittelt.

### **3.8.5 Klonierung und Sequenzierung**

Die Isolation von Plasmid-DNA, Restriktionsspaltung, gelelektrophoretische Auftrennungen von Nukleinsäuren sowie die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte nach den Protokollen von Sambrook et al. (1989). Der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (Stratagene) wurde durch Elektroporation transformiert. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die *E. coli*-Zellen für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf einer LB-Agar-Platte mit dem Antibiotikum Ampicillin ausplattiert. Die DNA-Sequenzierung wurde im Sequenzierlabor des IPK in Gatersleben durchgeführt.

### **3.8.6 Radioaktive Markierung von DNA-Proben**

Zur Southern-Hybridisierung wurden die DNA-Proben mit Hilfe des HexaLabel™ DNA-Labeling-Kits (Fermentas) durch den Einbau von  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP radioaktiv markiert. Es wurden jeweils 100 ng DNA eingesetzt. Die Proben wurden vor Beginn der Hybridisierung bei 95°C für 10 min denaturiert.

### **3.8.7 Restriktionsverdau, Southern-Transfer und Southern-Hybridisierung**

Die Analyse bestimmter Repeat-Sequenzen bzw. deren relativer Kopienzahl erfolgte durch Southern-Hybridisierung (Southern, 1975). Dazu wurden genomische DNA oder PCR-Produkte mit den jeweiligen Restriktions-Enzymen separat gespalten, die Fragmente gelelektrophoretisch getrennt und mit Hilfe des Southern-Transfer in 20x SSC auf eine Nylon-Membran (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham) übertragen. Die Filter wurden bei 65°C in 0,5 M Natriumphosphat (pH 7,2), 7% SDS, 10 mM EDTA (Sambrook et al., 1989) unter Zugabe von 100 µg/ml denaturierter Heringssperma-DNA 3h vorhybridisiert und radioaktiv markierten spezifischen Sonden 20 h hybridisiert. Anschließend wurden die Filter dreimal in folgenden Lösungen bei 65° C für 10 - 20 min gewaschen: 2x SSC/0,5% SDS, 0,5x SSC/0,5% SDS und 0,1x SSC/0,5% SDS. Abschließend wurde die Membran auf einem autoradiographischen Film (Hyperfilm<sup>TM</sup>MP, Amersham) bei -80°C exponiert oder mit Hilfe des Phospho-Imagers (FLA 3000, FUJIFILM, Advanced-Image-Data-Analyser (AIDA) 2.11 Raytest Isotopenmessgeräte) ausgewertet.

## **3.9 Zytologische Methoden**

### **3.9.1 Chromosomenpräparation**

Präparate wurden angefertigt zur Chromosomenbestimmung (feulgengefärbte Chromosomen), für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, die Silberfärbung und für die indirekte Immunmarkierung.

#### **3.9.1.1 Quetschpräparation von feulgengefärbten und enzymatisch behandelten Wurzelspitzen**

Zur Anreicherung kondensierter Chromosomen wurden Wurzelspitzen für 24 h in Eiswasser aufbewahrt. Die Fixierung erfolgte in einem Essigsäure-Ethanol-Gemisch (1:3) für zwei Tage bei RT. Zur längeren Aufbewahrung wurden die fixierten Wurzeln in 70% Ethanol überführt und bei 4°C gelagert.



### **3.9.1.2 Feulgenfärbung**

Nach der Behandlung mit 1N Salzsäure bei 60°C für 10 min kamen die Wurzelspitzen zur Anfärbung der DNA für mindestens 10 min in Feulgenlösung.

### **3.9.1.3 Enzymbehandlung**

Bei der Enzymbehandlung wurden die Wurzeln 20 min bei 37°C mit 2,5% Zellulase, 2,5% Pektinase und 2,5% Pektolyase (in 1x Natrium-Citratpuffer gelöst) behandelt. Quetschpräparate von Wurzelspitzenmeristemen wurden aus feulgengefärbten oder enzymbehandelten Wurzelspitzen angefertigt, die in 45% Essigsäure zwischen Objektträger und Deckglas gequetscht wurden.

### **3.9.1.4 Präparate für die indirekte Immunfärbung**

Für die indirekte Immunfärbung wurden die Wurzelspitzen nach der Eiswasserbehandlung in 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert und 20 min bei 37°C mit 2,5% Zellulase, 2,5% Pektinase und 2,5% Pektolyase (in 1x PBS gelöst) behandelt und dann in 1x PBS zwischen Objektträger und Deckglas gequetscht. Nach dem Quetschen wurden die Präparate in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, dann das Deckglas abgesprengt und anschließend sofort in 1x PBS überführt.

## **3.9.2 Zellkernsortierung und -präparation**

Zur Bereitung der Zellkernsuspensionen wurden sehr junge Blütenknospen für 20 min in 4% Formaldehyd (gelöst in Tris-Puffer: 10 mM Tris, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 100 mM NaCl, pH 7,5) fixiert. Anschließend wurden diese in vorgekühlten Petrischalen in eiskaltem Isolations-Puffer (10mM Tris, 10mM Na<sub>2</sub>EDTA und 100mM NaCl, 0,1% Triton X-100) (Dolezel et al., 1992) mit einer Rasierklinge gehackt und durch ein Nylonnetz mit 35 µm Maschenweite filtriert. Zur Bestimmung der Genomgröße wurde der Kernsuspension 1 µg/ml (DAPI) als Farbstoff dazugegeben. Die Sortierung der Zellkerne erfolgte entsprechend ihrer Ploidie in 2C- und 4C-Kerne mit dem Durchflusszytometer FACStar<sup>PLUS</sup> (Dr. J. Fuchs, IPK, Gatersleben). Jeweils 1000 sortierte Kerne wurden in Saccharoselösung (100 mM Tris-HCl (pH 7,0), 50 mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05% Tween 20,

5% Sucrose) auf die Objektträger aufgetragen. Zur längeren Aufbewahrung wurden diese lufttrocken bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **3.9.3 Silberfärbung der Nukleoli**

Die Präparate wurden für 10 min mit 0,01 M Boratpuffer inkubiert. Danach wurden einige Tropfen 50%ige Silbernitratlösung (gelöst in destilliertem Wasser, pH 4-5) (Bloom und Goodpasture, 1976) auf die Präparate gegeben, diese mit einem Nylonnetz abgedeckt und für 1,5 h bei  $60^{\circ}\text{C}$  in einer Feuchtkammer aufbewahrt (Hizume et al., 1980). Nach dem Waschen im destillierten Wasser wurden die Objektträger luftgetrocknet.

### **3.9.4 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung**

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde im wesentlichen so durchgeführt wie bei Fuchs und Schubert (1995) beschrieben. Das Protokoll dieser Technik lässt sich in mehrere Schritte unterteilen, die nachfolgend dargestellt werden sollen.

#### **3.9.4.1 Vorbereitung der Präparate**

##### **a) RNase-Behandlung**

Die RNase-Behandlung (100  $\mu\text{g/ml}$  in 2x SSC) erfolgte für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in der Feuchtkammer. Anschließend wurden die Präparate 3 x 5 min in 2x SSC gespült.

##### **b) Pepsinbehandlung**

Die Pepsinbehandlung (100  $\mu\text{g/ml}$  in 0,01N HCl) wurde für 20 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  in der Feuchtkammer durchgeführt. Danach erfolgte ein dreimaliges Spülen der Objektträger in 2x SSC.

##### **c) Paraformaldehyd-Behandlung**

Zum Nachfixieren der Chromosomen wurden die Präparate für 10 min in 4% Paraformaldehyd (gelöst in 2x PBS, pH 7,5) bei RT behandelt. Nach dem Spülen in 2x SSC (3 x 5 min) wurden die Präparate über eine Alkoholreihe entwässert und luftgetrocknet.

#### d) Denaturierung der Präparate

Die Objektträger wurden dazu für 2 min bei 70°C in 70% Formamid (verdünnt in 2x SSC) behandelt, danach sofort über eine eiskalte Alkoholreihe entwässert und dann luftgetrocknet.

#### **3.9.4.2 Markierung der DNA-Sonden**

Die Markierung der Sonden mit Biotin oder Digoxigenin erfolgte mit Hilfe der Nick-Translation (Rigby et al., 1977). Dazu wurde ein Nick-Translations-Kit (Roche) eingesetzt.

#### **3.9.4.3 Vorbereitung der Probe**

20 ng markierte DNA-Sonde wurde unter Zugabe von 10 µg DNA aus Lachssperma als Blockierungsreagenz über Nacht bei –20°C in Alkohol gefällt und das Pellet in 6 µl Hybridisierungsmix (20% Dextransulfat, 4x SSC) durch Schütteln für 30 min bei RT gelöst. Anschließend wurde 6 µl deionisiertes Formamid zugegeben, eine weitere halbe Stunde geschüttelt und die gelöste Sonde nach dem Denaturieren (5 min bei 90°C) sofort auf Eis gestellt.

#### **3.9.4.4 Hybridisierung**

Die denaturierte Sonde wurde auf die auf 45°C vorgewärmten, denaturierten Präparate aufgetropft, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogumm abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer Feuchtkammer (2x SSC).

#### **3.9.4.5 Posthybridisierungswaschungen**

Nach dem vorsichtigen Entfernen der Deckgläschen wurden die Objektträger zunächst 15 min in 50% Formamid/2x SSC und anschließend 3 x 5 min in 2x SSC bei 42°C gewaschen.

#### **3.9.4.6 Signaldetektion**

In Abhängigkeit von dem zur Markierung verwendeten Nukleotid (Digoxigenin-dUTP oder Biotin-dUTP) wurden zwei Wege zur Signaldetektion unterschieden, wobei in jedem Falle die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 5% BSA, 0,2% Tween 20, 4x SSC über 30 min bei 37°C in der Feuchtkammer erfolgte. Die Digoxigenin-markierten Sonden wurden anschließend mit Schaf-Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Verdünnung 1:100 in Detektionspuffer: 1% BSA, 4x SSC, 0,1% Tween- 20) und die Biotin-markierten Sonden mit Steptavidin-Alexa 488 (in Detektionspuffer 1:100 verdünnt) für 1 h bei 37°C in der Feuchtkammer detektiert. Nach dreimaligen Waschen in 4x SSC, 0,1% Tween 20 bei 42°C wurden die Signale der Digoxigenin-markierten Sonde verstärkt. Dies erfolgte über Esel-Anti-Schaf-Rhodamin (in Detektionspuffer 1:100 verdünnt) für 1 h bei 37°C in der Feuchtkammer. Danach wurden die Präparate 3 x 5 min in 4x SSC, 0,1% Tween-20 bei 42°C gewaschen und über eine Alkoholreihe dehydriert.

#### **3.9.4.7 Gegenfärbung der Chromosomen**

Nach dem letzten Entwässern wurden die Chromosomen mit DAPI-Lösung (1 µg DAPI/1 ml Vectashield (Molecular Probes) gegengefärbt. Die Kombination mit Vectashield verzögert das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe. Die so behandelten Objektträger konnten in Dunkelheit über einen längeren Zeitraum im Kühlschrank gelagert werden, ohne dass ein merklicher Signalverlust eintrat.

### **3.9.5 Kombination von Nukleolus-Silberfärbung und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung**

Bei der Kombination von Silberfärbung und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung erfolgte als Erstes die Silberfärbung, wie oben beschrieben. Anschließend wurden die luftgetrockneten Präparate den Schritten einer Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung unterzogen mit der Ausnahme, dass die Pepsinbehandlung unterlassen wurde.

#### **3.9.6 Indirekte Immunfluoreszenz-Markierung**

Die vorbereiteten Präparate wurden zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit einer Blockierungslösung mit 0,1% Triton-X-100, 8% BSA

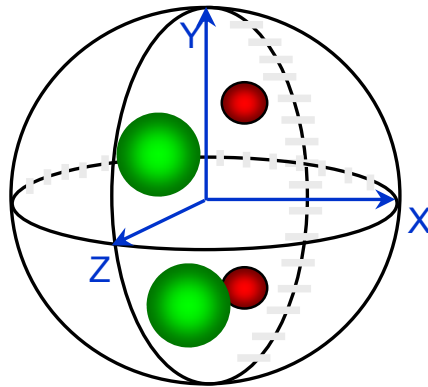
in 1x PBS für 30 min bei RT in einer Feuchtekammer behandelt. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C. Die primären Antikörper Anti-H3K4me<sub>1,2,3</sub>, Anti-H3K9me<sub>1,2,3</sub>, Anti-H3K27me<sub>1,2,3</sub> und Anti-H4K20me<sub>1,2,3</sub> (Upstate) wurden in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt. Für den Fluoreszenznachweis wurden die Präparate anschließend mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen-Cy3, 1:100 verdünnt, Jackson ImmunoResearch LABORATORIES) wiederum in einer feuchten Kammer für 1 h bei 37°C inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Präparate jeweils 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Chromosomen mit DAPI-Lösung (1 µg DAPI/1ml Vectashield) gegengefärbt.

### **3.9.7 Auswertungssysteme**

Die Ergebnisse wurden am Fluoreszenzmikroskop BX61 (Olympus) dokumentiert. Für jedes Fluorochrom wurden die entsprechenden Filtersätze benutzt. Die Dokumentation der Signale erfolgte mit der gekühlten CCD-Kamera ORCA-ER (Hamamatsu). Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm analySIS (Olympus).

### **3.10 Simulationsmodell**

Das Simulationsmodell (RSD-Modell) (Pecinka et al., 2004) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. A. Meister (IPK, Gatersleben) genutzt, um zufällig verteilte Häufigkeiten zu erhalten, die mit den mikroskopisch beobachteten Häufigkeiten verglichen werden können, und somit Aussagen über die Signifikanz der beobachteten Werte treffen zu können (Abb. 9). Es wurde angenommen, dass der Kern die Form einer Kugel hat. Der Durchmesser wurde durch Messung mehrerer 2C- bzw. 4C-Kerne mikroskopisch ermittelt. Die Nukleoli bzw. die Mikro-B-Chromosomen wurden ebenfalls als kugelförmige Objekte betrachtet, deren Durchmesser mikroskopisch bestimmt wurden. Ihre Koordinaten im Kern wurden durch Zufallszahlen berechnet. Anschließend wurden sie auf Assoziationen geprüft. Sie wurden als assoziiert betrachtet, wenn sie nicht mehr als 100 nm (unter der optischen Auflösung des Lichtmikroskops) voneinander entfernt waren. Die Auswertung erfolgte analog der mikroskopischen Auswertung zweidimensional.



**Abb. 9:** Simulationsmodell, in dem die Objekte (z. B. Nukleoli (grün) und mBs (rot)) in einem kugelförmigen Kern zufällig verteilt werden.

### 3.10.1 Statistische Methoden

Zum Vergleich von beobachteten und simulierten Häufigkeiten wurde der  $\chi^2$ -Test verwendet. Die Unterschiede zwischen 2C- und 4C-Kernen wurden ebenfalls mit diesem Test auf ihre Signifikanz geprüft. Die Entscheidung über Signifikanz erfolgte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% ( $P \leq 0,01$ ). Die Auswertung wurde mit dem Programm SigmaStat (Jandel Cooperation) vorgenommen.

### 3.11 Phylogenetische Methoden

Die phylogenetischen Vergleiche wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe J. N. Timmis (Universität von Adelaide, Australien) durchgeführt (Tab. 1). In Zusammenarbeit mit Dr. F. Blattner (IPK, Gatersleben) wurde ein Neighbor-Joining-Baum der ITS2-Sequenzen mit Maximum-Likelihood-Distanzen (entsprechend dem HKY85+G+I-Modell der Sequenzevolution) in PAUP\*4.0 (Swofford, 2002) kalkuliert, um die Beziehungen der B-Chromosomen-ITS2-Regionen mit ihren vermutlichen Vorgängern innerhalb der Gattung *Brachycome* zu definieren. Die statistische Unterstützung der Gruppen im phylogenetischen Baum wurde mit einer Bootstrap-Analyse (500 Wiederholungen) getestet.

Arten	Akzession- nummer
<i>B. breviscapis</i> C. Carter	AJ888135
<i>B. lineariloba</i> Race B (DC.) Druce	AJ888133
<i>B. lineariloba</i> Race C (DC.) Druce	AJ888134
<i>B. lineariloba</i> Race E (DC.) Druce	AJ888132
<i>B. dichromosomatica</i> A1 C. Carter	AJ888136
<i>B. dichromosomatica</i> A2 C. Carter	AJ888137
<i>B. dichromosomatica</i> A3 C. Carter	AJ888138
<i>B. dichromosomatica</i> A4 C. Carter	AJ888139
<i>B. Aff. curvicarpa</i> G. Davis	AJ888140
<i>B. angustifolia</i> Cunn. ex DC.	AJ888141
<i>B. campylocarpa</i> J. Black	AJ888142
<i>B. cardiocarpa</i> F. Muell. ex Benth.	AJ888143
<i>B. ciliaris</i> (Labill.) Less	AJ888144
<i>B. ciliocarpa</i> W. V. Fitz.	AJ888147
<i>B. curvicarpa</i> G. Davis	AJ888148
<i>B. dentata</i> Gaudich.	AJ888149
<i>B. eriogona</i> (J. Black) G. Davis	AJ888150
<i>B. exilis</i> Sonder	AJ888151
<i>B. goniocarpa</i> Sonder & F. Muell.	AJ888152
<i>B. gracilis</i> G. Davis	AJ888153
<i>B. iberidifolia</i> Benth.	AJ888154
<i>B. leptocarpa</i> F. Muell.	AJ888155
<i>B. melanocarpa</i> Sonder & F. Muell.	AJ888156
<i>B. muelleria</i> Sonder	AJ888157
<i>B. papillosa</i> G. Davis	AJ888158
<i>B. parvula</i> Hook f.	AJ888159
<i>B. procumbens</i> G. Davis	AJ888160
<i>B. rigidula</i> (DC.) G. Davis	AJ888162
<i>B. smithwhitei</i> P. Short & K. Watanabe	AJ888163
<i>B. tesquorum</i> J. Black	AJ888164
<i>B. tetrapterocarpa</i> G. Davis	AJ888165

**Tab. 1:** Übersicht über die *Brachycome*-Arten und ihre Akzessionsnummern, die für die phylogenetischen Vergleiche genutzt wurden. (Field et al. 2006)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analyse der ITS2-Sequenzen der rDNA von A-, Mikro-B- und Standard-B-Chromosomen des Cytodems A2

Zur Isolierung A-Chromosomen-spezifischer ITS2-Sequenzen wurde eine PCR mit ITS2-spezifischen Primern mit genomischer DNA von Genotypen ohne B-Chromosomen durchgeführt. Die Gewinnung von Mikro-B- und Standard-B-spezifischen ITS2-Sequenzen ist nur durch eine gezielte Isolation von B-Chromosomen möglich. Deshalb wurden mit Hilfe der Mikromanipulation jeweils 3 bis 5 Mikro-B- und Standard-B-Chromosomen isoliert und an deren DNA PCR-Reaktionen mit ITS2-spezifischen Primern durchgeführt. Es wurden ungefähr 217 bp große DNA-Fragmente amplifiziert. Nach der PCR erfolgte die Klonierung und Sequenzierung der Produkte. Die Sequenzanalyse (Anhang) wurde an 4 Klonen mit ITS2-Sequenzen von Genotypen ohne B-Chromosomen, an 5 Klonen mit ITS2-Sequenzen von Standard-B-Chromosomen und an 4 Klonen mit ITS2-Sequenzen von Mikro-B-Chromosomen durchgeführt. Die ITS2-Sequenzen unterschieden sich nur teilweise zwischen den verschiedenen Chromosomen-Typen. Die relativ hohe Ähnlichkeit der ITS2-Sequenzen deutet auf einen gemeinsamen Ursprung der auf den A- und B-Chromosomen lokalisierten rDNA-Sequenzen hin. Der Vergleich zwischen Standard-B-Chromosomen-Sequenzen und A-Chromosomen-Sequenzen und Mikro-B-Chromosomen-Sequenzen und A-Chromosomen-Sequenzen wies einige nichtkonstante Nukleotidunterschiede innerhalb der verglichenen Sequenzen auf. Die ITS2-Sequenzen der A-Chromosomen waren zu 99,2% identisch zueinander, während die ITS2-Sequenzen der Mikro-B- und Standard-B-Chromosomen zu 98,7% bzw. 98,24% zueinander gleich waren. Die Sequenzheterogenität unter den einzelnen B-Chromosomen-Sequenzen war höher als unter den ITS2-Sequenzen der A-Chromosomen. Das häufigere Auftreten von Substitutionen auf den rDNA-Sequenzen der B-Chromosomen könnte mit einer bevorzugten Akkumulation von Mutationen oder einer reduzierten Reparaturfrequenz auf den B-Chromosomen-lokalisierten Sequenzen erklärt werden. Um eventuelle Differenzen in den ITS2-Sequenzen der A- und B-Chromosomen der Cytodeme A1 und A2 ermitteln zu können, wurden die ITS2-Sequenzen des Cytodems A1 und der verwandten Art *B. lineariloba*, Zytotyp C (Donald et al., 1997) in die Sequenzanalyse mit



einbezogen. Auffallend bei dieser Analyse waren zwei beständige SNPs zwischen den Sequenzen von A- und B-Chromosomen, die mit Donalds Resultaten im Cytodem A1 übereinstimmen (Abb. 10). An der Basenposition 142 ist ein "A" in einigen ITS2-Sequenzen der Standard-B-Chromosomen der Cytodeme A1 und A2 präsent, während sich ein "G" in allen ITS2-A-Chromosomen-Sequenzen beider Cytodeme und in allen Mikro-B-Chromosomen des Cytodems A2 an dieser Position befindet. Die ITS2-Sequenz von *B. lineariloba* hat ein "A" an dieser Position. Dies könnte bedeuten, dass diese Art an dem Ursprung der B-Chromosomen beteiligt war oder beide einen gemeinsamen Vorgänger teilen. Die gleiche Aussage trifft auch für *B. breviscapis* zu, die bei einem Sequenzvergleich mehrerer *Brachycome*-Arten ebenfalls diesen Nukleotidaustausch hat. In den anderen *Brachycome*-Arten wurde an dieser Position kein weiterer Austausch festgestellt. Das bestätigt die Einordnung von *B. dichromosomatica*, *B. lineariloba* und *B. breviscapis* in eine Gruppe, wie sie von Davis (1948) aufgestellt wurde. Die Substitution an der Position 142 beinhaltet einen für das Restriktionsenzym *Sfc*1-spezifischen Restriktionsort in der Standard-B-ITS2-Sequenz. Die zweite beständige Substitution befindet sich an der Position 175. Hier ist ein "T" in einer Reihe von Mikro- und Standard-B-Sequenzen von Cytodem A2, was auf einen gemeinsamen Ursprung beider B-Chromosomentypen hinweisen könnte. Ein "T" befindet sich auch in allen A-Chromosomen-ITS2-Sequenzen des Cytodems A1. Dies lässt einen Ursprung der B-Chromosomen in der Zeit vor der Entstehung der Cytodeme vermuten. Dagegen befindet sich an dieser Position ein "A" in den A-Chromosomen-Sequenzen des Cytodems A2 und in den ITS2-Sequenzen von *B. lineariloba*, was auf einen gemeinsamen Vorfahren deutet. An der Position 175 befindet sich ein spezifischer Restriktionsort für das Restriktionsenzym *Hpy*CH<sub>4</sub>V in der A-Chromosomen-ITS2-Sequenz. Der Nukleotidaustausch in den B-Chromosomen-Sequenzen an dieser Position wurde in keiner anderen untersuchten ITS2-Sequenz anderer *Brachycome*-Arten gefunden, was auf die Beteiligung einer anderen noch unbekannten Art an dem Ursprung der B-Chromosomen schließen lässt.

	142	*	175
<b>A2-A1</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>A2-A2</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>A2-A3</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>A2-A4</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>A2-nB1</b>	:	CTACAGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTAAAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>A2-nB2</b>	:	CTACAGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>A2-nB3</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>A2-nB4</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCITCTTAATAGACCCA	
<b>A2-nB5</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCITCTTAAGAGACCCA	
<b>A2-mB1</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCITCTTAATAGACTCA	
<b>A2-mB2</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAATGTGCITCTTAATAGACCCA	
<b>A2-mB3</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAATAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>A2-mB4</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTACAAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>A1-A1</b>	:	CTACGGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCITCTTAATAGACCCA	
<b>A1-nB1</b>	:	CTACAGAATCGTGTCGTGTGTCTTTTCAAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	
<b>B1 in1</b>	:	CTACAGAATCGTGTCGCGTGTCTTTTATAAAAGGTGCATCTTAATAGACCCA	

**Abb. 10:** Vergleich von ITS2-Sequenzen von A-Chromosomen (A2-A1-4), Standard-B-Chromosomen (A2-nB1-5) und Mikro-B-Chromosomen (A2-mB1-4) von *B. dichromosomatica* Cytothem A2 und ITS2-Sequenzen von A-Chromosomen (A1-A1) und Standard-B-Chromosomen (A1-nB1) von *B. dichromosomatica* Cytothem A1 und von *B. lineariloba*, Zytotyp C (Donald et al., 1997). Signifikante SNPs an den Positionen 142 und 175 sind rot markiert.

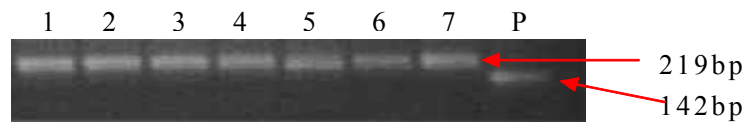
#### 4.1.1 Wie konserviert ist der ITS2-Sequenz-Polymorphismus der B-Chromosomen?

Der Standard-B-Chromosomen-spezifische Polymorphismus an der Basenpaarposition 142 wurde detaillierter untersucht. Es stellte sich die Frage, ob dieser von Donald et al. (1997) für Cytothem A1 beschriebene Polymorphismus B-Chromosomen-spezifisch für alle Cytotheme von *B. dichromosomatica* ist. Die Substitution an der Position 142 beinhaltet einen für das Restriktionsenzym *Sfc1*-spezifischen Restriktionsort in der Standard-B-ITS2-Sequenz. Um die B-Chromosomen-Spezifität dieses Restriktionsortes zu testen, wurde dieser ITS2-Abschnitt in allen vier Cytothem mit und ohne B-Chromosomen einschließlich der verwandten Art *B. lineariloba* (Zytotyp B, C, E) untersucht. *B. lineariloba* (Zytotyp C) wurde als Positivkontrolle eingesetzt, da hier von Donald et al. (1997) an der Basenpaarposition 142 ein beständiger *Sfc1*-spezifischer Restriktionsort festgestellt wurde. Nach der PCR-Amplifikation mit einem fluoreszenzmarkierten Primer erfolgte der Verdau der ITS2-Fragmente mit dem Enzym *Sfc1*. Anschließend erfolgte die Analyse mit dem ALFexpress. Es zeigte sich eine zusätzliche Bande mit

einer Größe von ungefähr 142 bp in allen Proben von *B. lineariloba* und allen *B. dichromosomatica*-Pflanzen mit Standard-B-Chromosomen der Cytodeme A1, A2 und A4 (Tab. 1). Dagegen zeigte die Pflanze A3/c des Cytodems A3 mit Standard-B-Chromosomen keine *Sfc1*-spezifische Bande. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass dieses Cytodem geographisch 1000 km entfernt von den anderen Cytodemen wächst und einen anderen Typ von Standard-B-Chromosomen trägt. Auffallend war, dass dieser sogenannte B-spezifische *Sfc1*-Restriktionsort in Cytodem A1 auch in einer Pflanze (A1/b) ohne B-Chromosomen auftrat. Nach mikroskopischer Analyse und Southern-Hybridisierung mit der Standard-B-spezifischen Probe Bd49 konnte bestätigt werden, dass diese Probe keine zusätzlichen B-Chromosomen besitzt. Zur Ermittlung der Häufigkeit dieser Standard-B-spezifischen Sequenz auf den A-Chromosomen wurden die ITS2-Sequenzen der entsprechenden Pflanze PCR-amplifiziert und geklont. Die DNA von 100 Klonen wurden anschließend mit dem Restriktionsenzym *Sfc1* verdaut. Als Positivkontrolle diente ein *Sfc1*-Verdau einer Standard-B-Chromosomen-positiven *Sfc1*-Probe (Abb. 11). Kein *Sfc1*-spezifischer Verdau A-Chromosomen-lokalisierter ITS2-Sequenzen wurde nachgewiesen. Daraus ist zu schließen, dass nur sehr wenige Kopien (<1%) der *Sfc1*-positiven ITS2-Sequenz auf den A-Chromosomen zu finden sind. Diese konnten mit dem beschriebenen Klonierungsexperiment nicht erfasst werden.

Pflanze/ Kontrollplasmid	Chromosomenzahl	<i>Sfc1</i> - Restriktionsort	Genotyp
<i>B. lineariloba</i> E	2n=10	ja	S1/8
<i>B. lineariloba</i> B	2n=12	ja	S3/2
<i>B. lineariloba</i> C	2n=16	ja	S5/11
<i>B. dichromosomatica</i> A1	2n=4	nein	A1/a
<i>B. dichromosomatica</i> A1	2n=4	ja	A1/b
<i>B. dichromosomatica</i> A1	2n=4	nein	A1/c
<i>B. dichromosomatica</i> A1	2n=4 + nB	ja	A1/d
<i>B. dichromosomatica</i> A1	2n=4 + nB	ja	A1/e
<i>B. dichromosomatica</i> A1	2n=4 + nB	ja	A1/f
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4	nein	A2/7
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4	nein	S12/1
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4	nein	S13/1
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4	nein	S14/2
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4	nein	S14/12
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4	nein	S14/13
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4	nein	S20/1
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4 + nB	ja	S17/4
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4 + nB	ja	S24/8
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4 + nB	ja	S34/9
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4 + nB	ja	S24/3b
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4 + mB	nein	S29/14a
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4 + mB + nB	ja	S32/3b
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4 + mB	nein	S29/7b
<i>B. dichromosomatica</i> A2	2n=4 + mB	nein	S28/3
<i>B. dichromosomatica</i> A3	2n=4	nein	A3/a
<i>B. dichromosomatica</i> A3	2n=4	nein	A3/b
<i>B. dichromosomatica</i> A3	2n=4 + nB	nein	A3/c
<i>B. dichromosomatica</i> A4	2n=4	nein	A4/a
<i>B. dichromosomatica</i> A4	2n=4 + nB	ja	A4/b
<i>B. dichromosomatica</i> A4	2n=4 + nB	ja	A4/c
Plasmid-DNA A2 + <i>Sfc1</i>	nB	ja	1-2
Plasmid-DNA A2 + <i>Sfc1</i>	nB	ja	1-4
Plasmid-DNA A2 - <i>Sfc1</i>	nB	nein	1-8
Plasmid-DNA A2 - <i>Sfc1</i>	nB	nein	1-10
Plasmid-DNA A2	0B	nein	1-9
Plasmid-DNA A2	0B	nein	1-11

**Tab. 2:** Ergebnisse der Analyse des *Sfc1*-Verdaus der ITS2-Fragmente mit dem ALFexpress. Plasmid-DNA A2 = Kontrolle; - *Sfc1* = kein *Sfc1*-Restriktionsort vorhanden; + *Sfc1* = *Sfc1*-Restriktionsort vorhanden; A1, A2, A3, A4 = Cytodeme von *B. dichromosomatica*; nB = Standard-B-Chromosomen, mB = Mikro-B-Chromosomen.



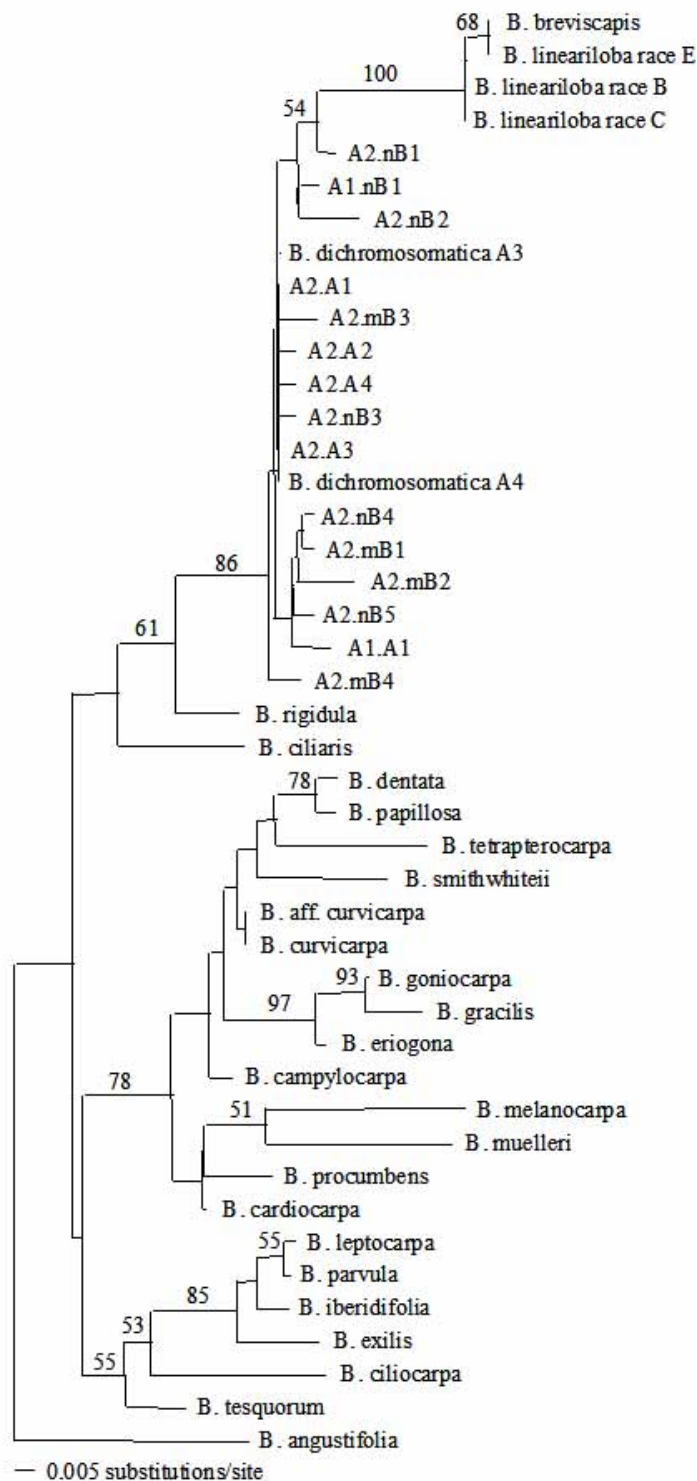
**Abb. 11:** Analyse des *Sfc1*-Verdaus von Klonen der ITS2-PCR von genomischer DNA der Cytodem A1-Probe A1/b ohne B-Chromosomen. 1-7: A1-0B-Klone; P: Positivkontrolle (Standard-B-Chromosomen-positive *Sfc1*-Probe).

#### 4.1.2 Vergleich der ITS2-Sequenzen von *B. dichromosomatica* mit anderen *Brachycome*-Arten

Um Beziehungen zur Herkunft der B-Chromosomen zu anderen *Brachycome*-Arten herstellen zu können, wurden die ITS2-Sequenzen der A- und B-Chromosomen des Cytodems A2 von *B. dichromosomatica* mit ITS2-Sequenzen von anderen Cytodemen von *B. dichromosomatica* und engen verwandten Arten phylogenetisch miteinander verglichen. Dazu wurde eine Neighbor-Joining-Clusteranalyse genutzt, die paarweise die Distanzen zwischen den Sequenzen berechnet und die Sequenzen entsprechend ihren Ähnlichkeiten gruppiert. Die Analyse der Daten ergab die Unterteilung in zwei Hauptgruppen. Die erste Hauptgruppe umfasst *B. ciliaris*, *B. rigidula*, *B. lineariloba* C, B und E, *B. breviscapis* und *B. dichromosomatica*, Cytodem A1 bis A4. *B. rigidula* ist Schwestertaxon zu *B. lineariloba* C, B und E, *B. breviscapis* und *B. dichromosomatica*, Cytodem A1 bis A4. Die drei Zytotypen von *B. lineariloba* und *B. breviscapis* bilden in dieser Gruppe eine Untergruppe, die sich aus der anderen Untergruppe mit den vier Cytodemen von *B. dichromosomatica* herausbildet. Die Standard-B-Chromosomen der Cytodeme A1 und A2 und die Mikro-B-Chromosomen von A2 sind in der Untergruppe der vier Cytodeme von *B. dichromosomatica* verteilt und bilden keine eigene monophyletische Gruppe, was mit dem polymorphen Charakter der B-Chromosomen-ITS2-Sequenzen zu erklären ist. Die phylogenetischen Analysen zeigten, dass die B-Chromosomen den A-Chromosomen am ähnlichsten sind, aber auch eine Verbindung zu *B. lineariloba* und *B. breviscapis* haben. Die zweite Hauptgruppe umfasst die restlichen untersuchten *Brachycome*-Arten. Die phylogenetischen Analysen der Sequenzdaten ermittelten keine Art, die ITS2-Sequenzen enthielt, die ähnlicher zu denen der B-Chromosomen war als die der

A-Chromosomen von *B. dichromosomatica* (86% Bootstrap-Unterstützung). Das verstärkt die Annahme, dass die rDNA der B-Chromosomen von den A-Chromosomen abstammt.

Aus den phylogenetischen Daten geht hervor, dass die Arten *B. dichromosomatica*, *B. lineariloba* und *B. breviscapis* wahrscheinlich einen gemeinsamen Vorgänger besitzen und später eine unterschiedliche Evolution vollzogen. (Abb. 12).



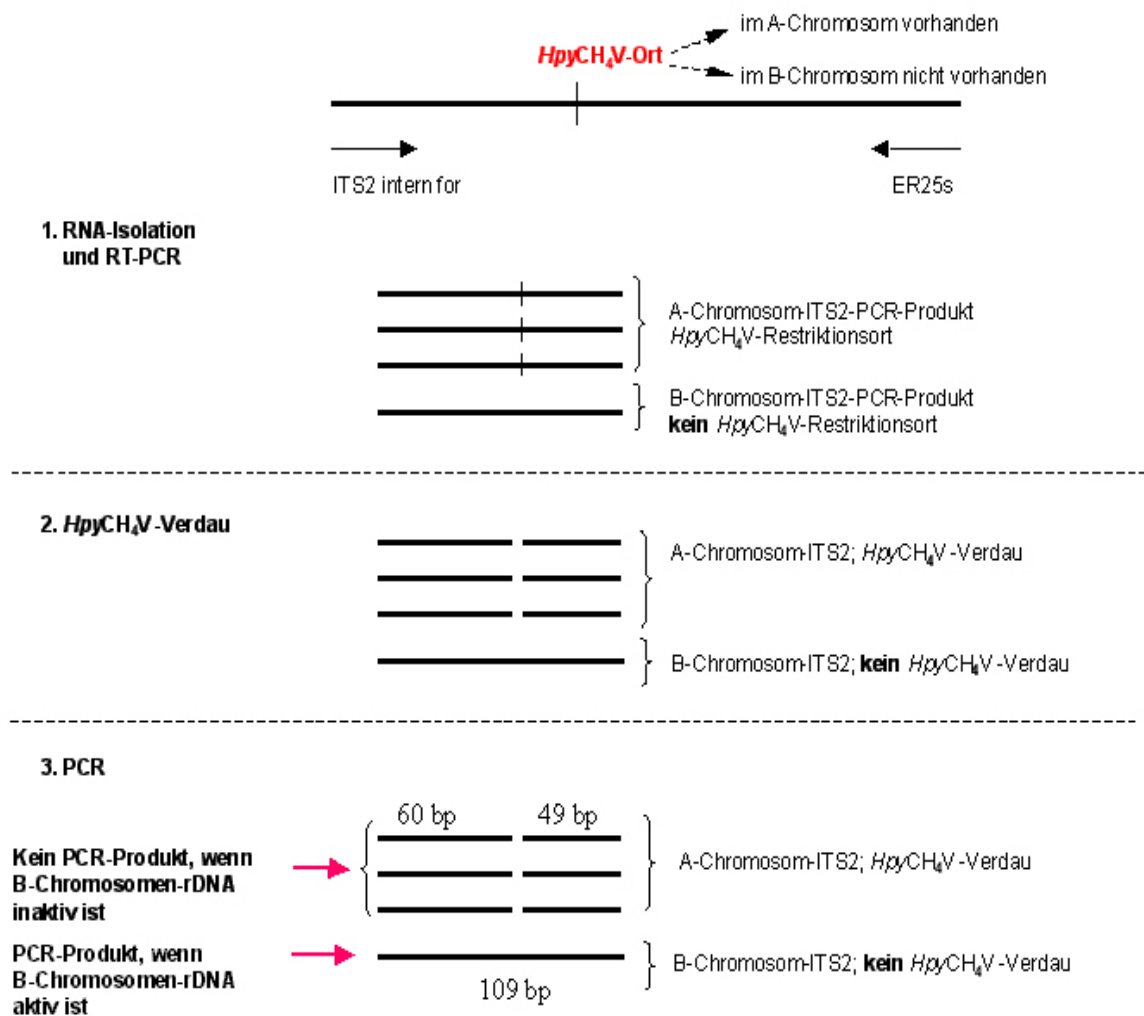
**Abb. 12:** Phylogenetischer Baum (Neighbor Joining) von ITS2-Sequenzen, isoliert von verschiedenen *Brachycome*-Arten.  
A1, A2, A3, A4 = Cytodeme von *B. dichromosomatica*; A2.A1-4 = ITS2-Sequenzen der A-Chromosomen; nB = Standard-B-Chromosomen; mB = Mikro-B-Chromosomen; 0B= ohne B-Chromosomen.

## **4.2 Bestimmung des potentiellen Transkriptionszustandes von B-Chromosomen-lokalisierten 45S rRNA-Genen**

Zur Ermittlung des Transkriptionszustandes der auf den B-Chromosomen lokalisierten rDNA sollte die RT-PCR genutzt werden.

Dazu wurde folgende Strategie erarbeitet: Zur Unterscheidung der ITS2-Sequenzen der A-Chromosomen von den ITS2-Sequenzen der B-Chromosomen sollte der einzelne A-Chromosomen-spezifische *Hpy*CH<sub>4</sub>V-Restriktionsort an Position 175 genutzt werden. Nach der RNA-Isolation sollte eine RT-PCR durchgeführt werden. Das amplifizierte PCR-Produkt wird dann mit dem Restriktionsenzym *Hpy*CH<sub>4</sub>V verdaut und nur die ITS2-Sequenzen der A-Chromosomen sollten verdaubar sein. Das Gemisch aus verdauten und unverdauten DNA-Fragmenten wird für eine zweite PCR genutzt. Ist die rDNA der B-Chromosomen transkriptionsaktiv, sollte die PCR in einem Amplifikationsprodukt resultieren. Wird kein PCR-Produkt produziert, könnte daraus geschlossen werden, dass die auf den B-Chromosomen lokalisierte 45S rDNA transkriptionsinaktiv ist (Abb. 13).





**Abb. 13:** Strategie für den molekularbiologischen Nachweis der Transkriptionsaktivität der ITS2- Sequenzen von B-Chromosomen

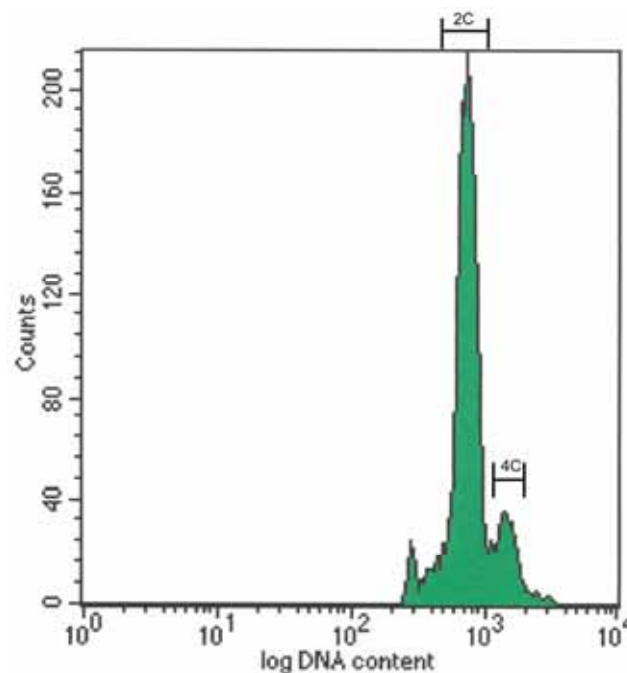
Als Vorarbeit wurde diese Strategie an genomischer DNA erprobt. Dafür wurden jeweils 10 Genotypen ohne B-Chromosomen, mit Mikro-B- und Standard-B-Chromosomen verwendet. Die verdauten ITS2-PCR-Produkte wurden auf 4% Metaphoragarose aufgetragen, um eine gute Auftrennung der kleinen Fragmente mit einer Größe von 60 bp und 45 bp zu gewährleisten. Erwartungsgemäß wurden alle PCR Produkte der Genotypen ohne B-Chromosomen verdaut. Die PCR-Produkte der Genotypen mit B-Chromosomen zeigten überraschend nur teilweise zusätzliche unverdaute Banden. Um ausschließen zu können, dass kleinste Fragmentmengen mit dieser Methode nicht detektiert wurden, erfolgte eine Southern-Hybridisierung der verdauten PCR-Produkte mit den markierten ITS2-Fragmenten. Das Ergebnis zeigte

erneut, dass nur teilweise zusätzliche unverdaute Banden bei den Genotypen mit Standard-B- und Mikro-B-Chromosomen zu finden sind. Diese Resultate weisen darauf hin, dass es B-Chromosomen gibt, die ausschließlich den A-Chromosomentypischen *Hpy*CH<sub>4</sub>V-Ort besitzen und solche, die polymorph sind und zusätzlich eine B-spezifische ITS2-Sequenz enthalten. Es kann gefolgert werden, dass der *Hpy*CH<sub>4</sub>V-Ort kein stabiles Merkmal für Mikro- und Standard-B-Chromosomen ist. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte die molekularbiologische Strategie nicht weiter verfolgt werden, da es nicht möglich war, die ITS2-Sequenzen der A- und B-Chromosomen eindeutig voneinander zu unterscheiden.

### **4.3 Indirekter Nachweis der Transkriptionsaktivität der Mikro-B-Chromosomen**

Zur Untersuchung der Transkriptionsaktivität der Mikro-B-lokalisierten 45S rDNA wurde die Position der Mikro-B-Chromosomen während der Interphase in Beziehung zu der Position des Nukleolus analysiert. Der Nukleolus ist der Ort der Transkription der rDNA, und aktive rDNA ist mit dem Nukleolus assoziiert (Shaw et al., 1996; Pikaard, 2002; Lim et al., 2004; Neves et al., 2005). Die Kombination von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und der Silberfärbung wurde angewendet, um eine indirekte Aussage über die Aktivität Mikro-B-lokalisierter rDNA-Gene zu ermöglichen. Um den Nukleolus als Region aktiver rDNA sichtbar zu machen, wurde die Silberfärbung (Hubbell, 1985) genutzt. Anschließend erfolgte die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung. Dazu wurde zur Ermittlung der Position der Mikro-B-Chromosomen im Nukleus mit der Mikro-B-spezifischen Sequenz Bdm29 hybridisiert und zum Detektieren der rDNA der A-Chromosomen und der Mikro-B-Chromosomen eine 45S rDNA-spezifische Sonde verwendet (Abb. 23). Grundlage dieses Experimentes ist die Annahme, dass die rDNA der Mikro-B-Chromosomen aktiv sein könnte, wenn die Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus assoziiert sind. Die Untersuchungen wurden an sortierten 2C- und 4C-Interphasekernen durchgeführt, um eventuelle Unterschiede zwischen beiden Kerntypen zu erkennen. Dazu wurden mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie aus jungen Blütenknospen von *B. dichromomatica* mit Mikro-B-Chromosomen Interphasekerne isoliert, entsprechend ihrer Ploidie (2C, 4C) sortiert und auf Objektträger aufgetropft (Abb. 14). Insgesamt wurden jeweils 300 2C- und 4C-Kerne untersucht. Bestimmt wurden die Assoziationen bzw. Separationen der A- und Mikro-B-Chromosomen mit

dem Nukleolus. Beobachtet wurden außerdem die Positionen der Mikro-B-Chromosomen im Kern, um eine eventuelle Korrelation zwischen potentieller rDNA-Aktivität und Position der Mikro-B-Chromosomen festzustellen sowie die Anzahl der Nukleoli, der A-Chromosomen-rDNA-Signale und der Mikro-B-Chromosomen.

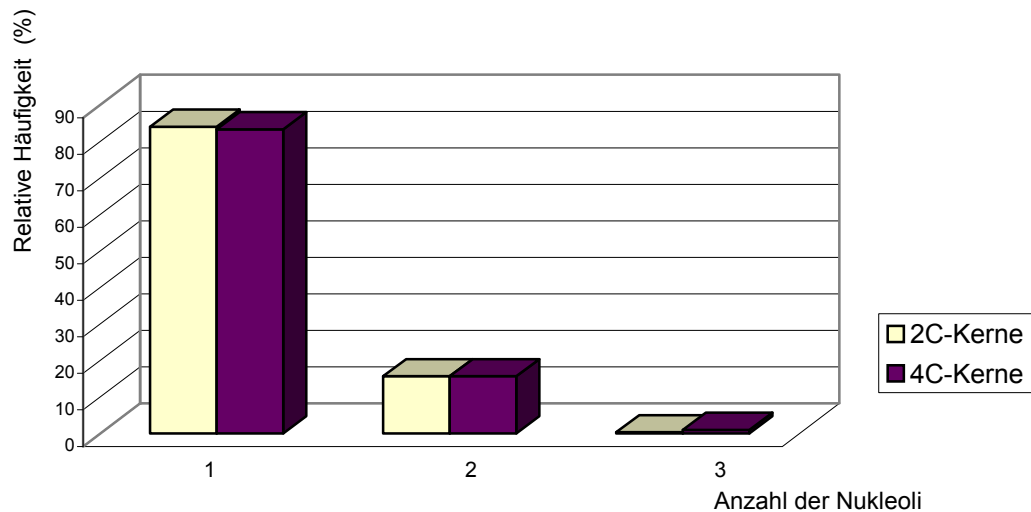


**Abb. 14:** Sortierung der Interphasezellkerne nach 2C- und 4C-Werten mittels Durchfluss-Zytometrie. Das Histogramm der Fluoreszenz-Intensität (in logarithmischer Darstellung) zeigt die Verteilung der Zellkerne nach DNA-Gehalt

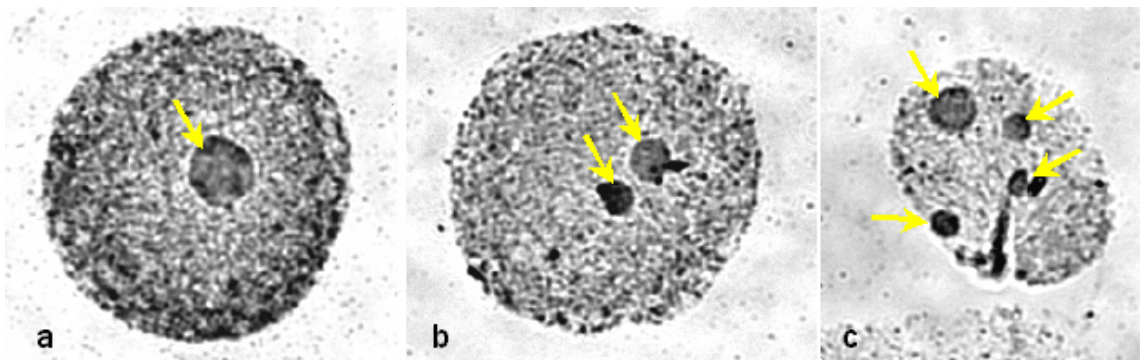
#### 4.3.1 Anzahl der Nukleoli in 2C- und 4C-Kernen

Unabhängig von der Anzahl der Mikro-B-Chromosomen waren zu 84% Kerne mit einem Nukleolus beobachtet worden. 15% der Kerne hatten zwei Nukleoli und rund 1% der Kerne hatten drei oder mehr Nukleoli (Abb. 15, 16). Das Auftreten von zwei Nukleoli kann durch das zweimalige Vorhandensein des A-Chromosoms 2 im diploiden Kern erklärt werden. Bei Kernen mit nur einem Nukleolus, ist anzunehmen, dass die Nukleoli des A-Chromosoms 2 in diesem Fall fusioniert sind. Mikro-B-Chromosomen bilden anscheinend nur selten Nukleoli, was den geringen Prozentsatz von drei oder mehr Nukleoli erklärt. Diese Nukleoli haben eine kleinere

Größe als die der A-Chromosomen. Die Verteilung der Anzahl der Nukleoli ist in 2C- und 4C-Kernen annähernd gleich. Der geringe Unterschied ist nicht signifikant.



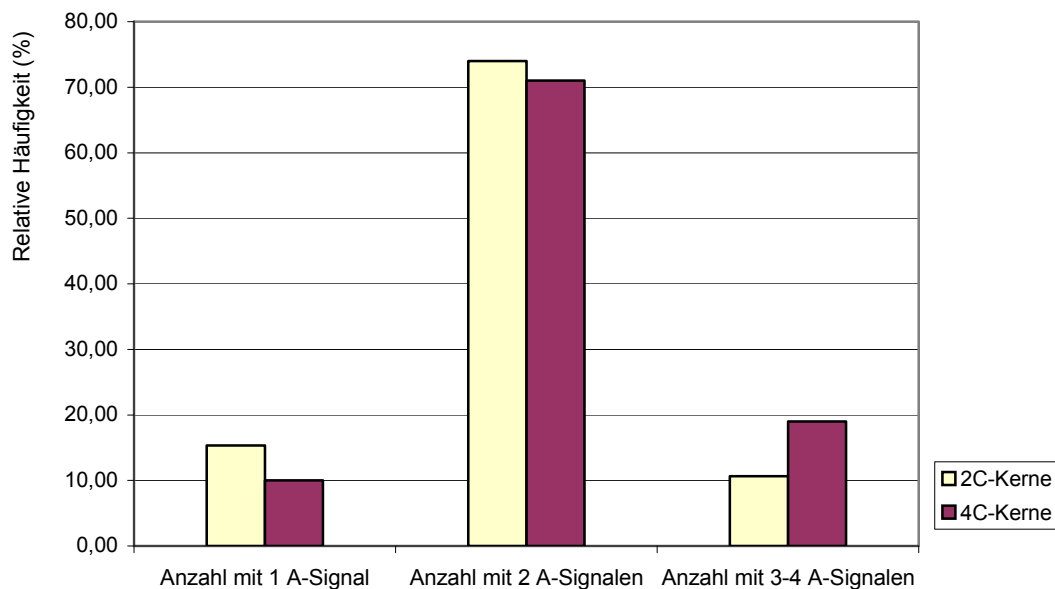
**Abb. 15:** Relative Häufigkeit (%) der Anzahl der Nukleoli in jeweils 300 2C- und 4C-Kernen.



**Abb. 16:** Unterschiedliche Anzahl von Nukleoli nach der Silberfärbung von Zellkernen von *B. dichromosomatica*. (a) 1 Nukleolus, (b) 2 Nukleoli, (c) 3 Nukleoli; Nukleoli sind durch gelbe Pfeile markiert.

### 4.3.2 Anzahl A-Chromosomen-spezifischer 45S rDNA-Signalkluster

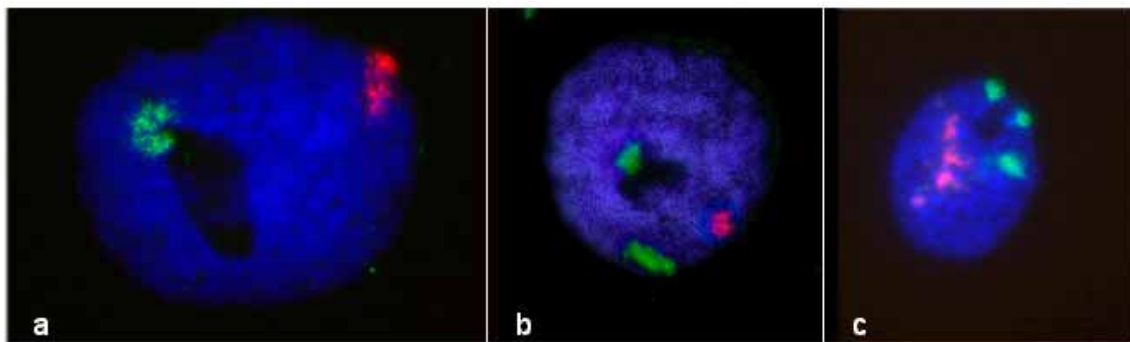
In den 2C-Kernen wiesen 15,3% der Interphasekerne ein, 74% zwei und 10,7% drei bis vier A-Chromosomen-spezifische 45S rDNA-Signalkluster (A-Signale) auf. In den 4C-Kernen hatten 10% der Interphasekerne ein, 71% zwei und 19% drei bis vier A-Signale (Abb. 17). Die höhere Anzahl von drei bis vier A-Signalen in 4C-Kernen resultiert aus der Replikation der Chromosomen in der S-Phase des Zellzykluses und der Schwesterchromatidenseparation. Die Verteilung unterscheidet sich signifikant zwischen 2C und 4C-Kernen ( $P \leq 0,005$ ).



**Abb. 17:** Relative Häufigkeit (%) von 1, 2, oder 3-4 rDNA Signalklustern der A-Chromosomen in jeweils 300 2C- und 4C-Kernen.

Das Auffinden von hauptsächlich zwei A-Signalen (Abb. 18 b) auch in 4C-Kernen kann damit erklärt werden, dass die Schwesterchromatiden nach der Replikation sehr eng aneinander liegen und es somit nicht möglich ist, in den 4C-Kernen die einzelnen 45S rDNA-Signale der Chromatiden separat zu erkennen. Die räumliche Nähe der 45S rDNA-Regionen in den 2C- und 4C-Kernen könnte eine Erklärung für das Auftreten von nur einem A-Signal (Abb. 18 a) erklären. Das alternierende Auftreten von Abschnitten kondensierter transkriptionsinaktiver und dekodensierter transkriptionsaktiver 45S rDNA-Abschnitte (Carmo-Fonseca et al., 2000) könnte das

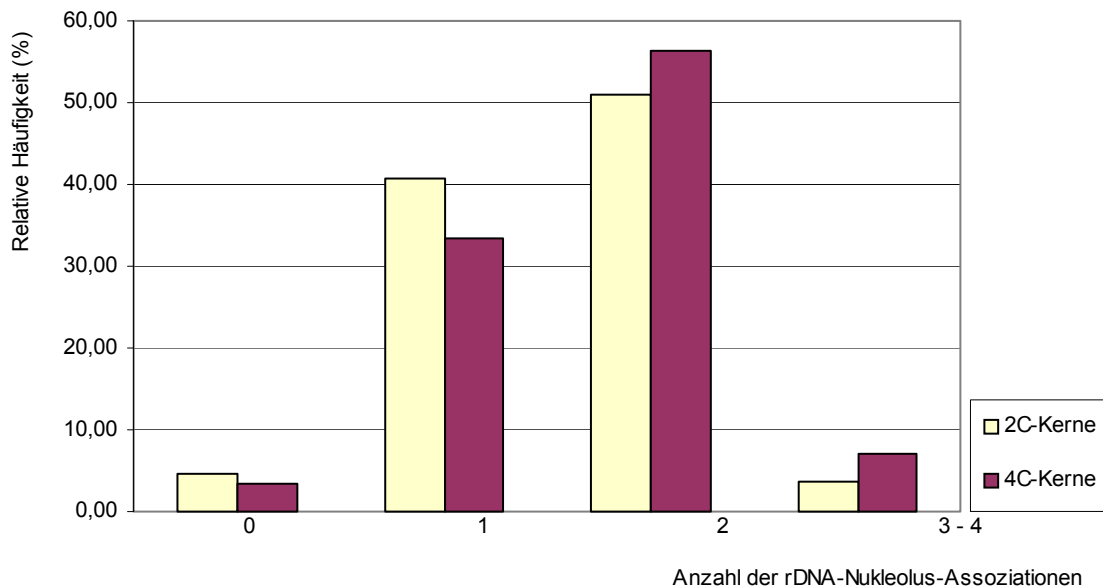
Auftreten von drei bis vier 45S rDNA-Signalen (Abb. 18 c) in 2C-Kernen begründen. Dekondensierte Abschnitte sind wahrscheinlich aufgrund der geringeren rDNA-Kopiendichte mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung nicht detektierbar, und es kommt somit zu einer scheinbaren Unterbrechung der rDNA-Signale. Schubert et al. (2006) fanden in *A. thaliana*, dass das Auffinden von mehr als zwei Hybridisierungsignalen in 4C-Kernen mit einer unvollständigen Kohäsion der Schwesterchromatiden zusammenhängt.



**Abb. 18:** Unterschiedliche Anzahl A-Chromosomen-lokalisierter 45S rDNA-Signale in Zellkernen mit Mikro-B-Chromosomen. (a) 1 A-Signal, (b) 2 A-Signale, (c) 3 A-Signale; Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde mit der Mikro-B-spezifischen Probe Bdm29 (rot) und der 45S rDNA (grün) durchgeführt. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

### 4.3.3 Anzahl der Assoziationen der A-Chromosomen-spezifischen 45S rDNA mit dem Nukleolus

Die Assoziation von zwei A-Signalen mit dem Nukleolus wurde am häufigsten beobachtet (2C: 51%, 4C: 56,3%), gefolgt von der Assoziation von nur einem A-Signal (2C: 40,7%, 4C: 33,3%) und der Assoziation von drei bis vier A-Signalen (2C: 3,7%, 4C: 7%). Überhaupt keine Assoziation trat ebenfalls in einem geringen Prozentsatz auf (2C: 4,6%, 4C: 3,4%) (Abb. 19). Die unterschiedliche Anzahl der Assoziationen lässt sich auf die gleichen Ursachen zurückführen, wie das Auftreten der unterschiedlichen Anzahl von A-Chromosomen-spezifischen 45S rDNA-Signalklustern. Die Unterschiede in 2C- und 4C-Kernen waren statistisch nicht signifikant.

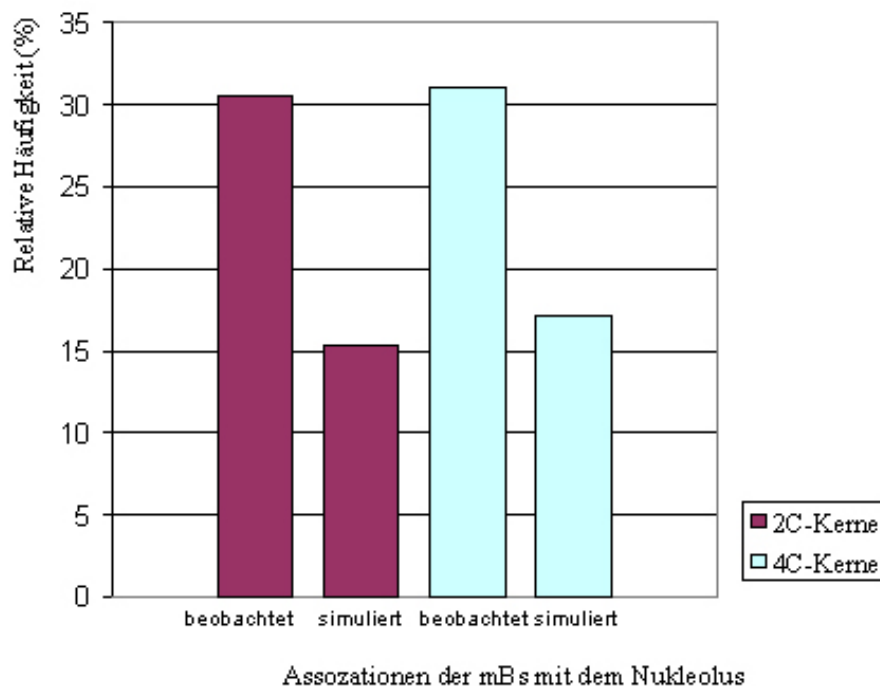


**Abb. 19:** Relative Häufigkeit (%) der Anzahl der Assoziationen der 45S rDNA-Signalkluster der A-Chromosomen mit dem Nukleolus in jeweils 300 2C- und 4C- Kernen.

#### 4.3.4 Anzahl Mikro-B-Chromosomen-spezifischer Bdm29-Signalkluster mit 45S rDNA-Signalen und ihre Assoziationen mit dem Nukleolus

Es wurden Interphasekerne mit bis zu zehn Mikro-B-Chromosomen gefunden. Die Variation der Anzahl der Mikro-B-Chromosomen innerhalb einer Pflanze tritt wahrscheinlich durch ihre irreguläre Teilung in der mitotischen Anaphase auf (Carter und Smith-White, 1972). Am häufigsten traten Kerne mit einem Mikro-B-Chromosomen auf. Die Analyse der Assoziationen Mikro-B-Chromosomen-spezifischer Bdm29-Signalkluster mit 45S rDNA-Signalen (B-Signale) mit dem Nukleolus ergab, dass 30% von allen Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus assoziierten, während 70% der B-Signale nicht assoziiert waren (Abb. 20). Die Verteilung der Assoziationen ist in 2C- und 4C-Kernen annähernd gleich. Der geringe Unterschied ist nicht signifikant. Um eine Aussage treffen zu können, ob die ermittelten Assoziationen von biologischer Signifikanz sind, wurden sie mit der zufallsbedingten Zahl von Assoziationen verglichen (Simulationsmodell, siehe Material und Methoden, Abb. 9). Die statistische Auswertung ergab eine hohe Signifikanz des Unterschiedes zwischen zufälligen und beobachteten Assoziationen

der Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus ( $P \leq 0,001$ ). Dieses Ergebnis könnte bedeuten, dass die Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus nicht zufällig assoziieren und zumindest einige rDNA-Sequenzen der Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus assoziieren und somit Transkriptionsaktivität zeigen könnten. Die Lage der rDNA-Signale auf den Mikro-B-Chromosomen war nicht immer eindeutig nachweisbar, da diese Sequenzen auf den Mikro-B-Chromosomen in geringer Kopienzahl existieren.



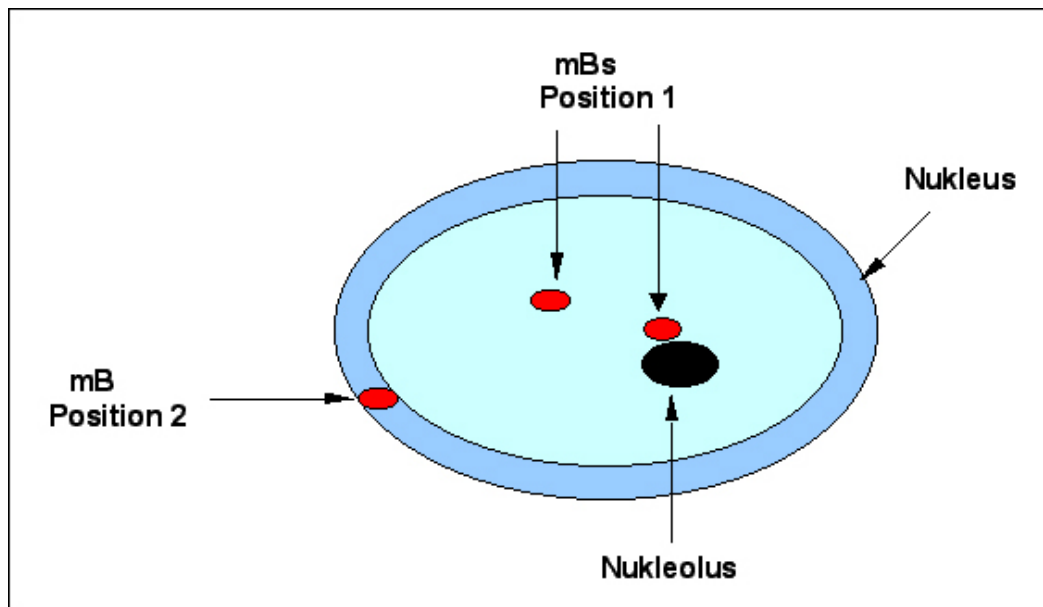
**Abb. 20:** Relative Häufigkeit (%) der beobachteten und simulierten Assoziationen der Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus in jeweils 300 2C- und 4C-Kernen.

#### 4.3.5 Ermittlung der Positionen der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern

Mayr et al. (2003) führten vergleichende Studien über die funktionelle Genomarchitektur in pflanzlichen (*Allium cepa*, *Pisum sativum*) und tierischen (*Cricetulus griseus* [Chinesischer Hamster], *Drosophila melanogaster*) Zellkernen durch. Die Untersuchungen ergaben eine Verteilung des frühreplizierenden transkriptionsaktiven Euchromatins im Zellkerninneren und des spätreplizierenden transkriptionsinaktiven Heterochromatins in der Peripherie des Zellkerns.



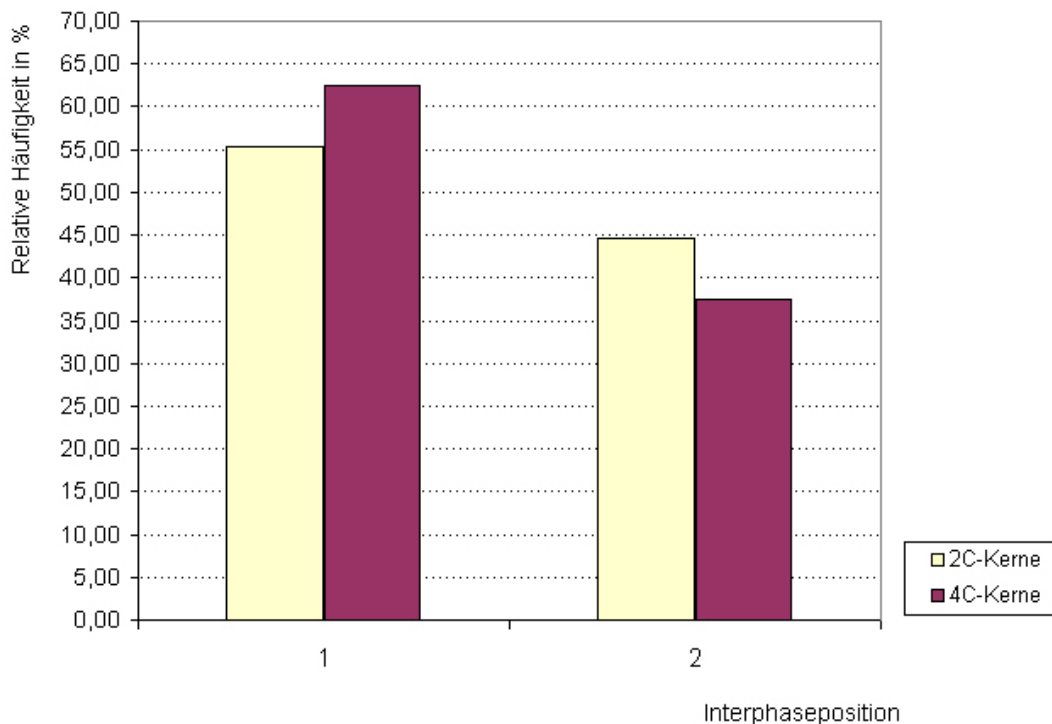
Analog dazu sollte anhand der Positionen der Mikro-B-Chromosomen eine Aussage über die potentielle Transkriptionsaktivität getroffen werden. Um die Positionen der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern zu ermitteln, wurde der Zellkern in zwei Abschnitte unterteilt (Abb. 21). In der Position 1 wurden die Mikro-B-Chromosomen, die sich im Inneren des Zellkerns befinden, ermittelt. Die Position 2 kennzeichnet die Region, an der die Mikro-B-Chromosomen am Rand des Zellkerns liegen. Aufgrund der Präparationsmethodik waren die Zellkerne sehr flach ( $Z=0,5\text{ }\mu\text{m}$ ), so dass statt einer dreidimensionalen Analyse nur eine zweidimensionale Analyse durchgeführt werden konnte.



**Abb. 21:** Modell der Positionierung der Mikro-B-Chromosomen (mB) im Interphasekern.

Um eine Erwartungsgröße für die Ergebnisse zu bekommen, wurden einfache geometrische Betrachtungen unter Einbeziehung der Größe der Mikro-B-Chromosomen und des Zellkerns durchgeführt. Daraus wurde eine Größe für die Randzone (Position 2) von 21% (2C) bzw. 28% (4C) und für die innere Kernzone (Position 1) von 79% (2C) bzw. 72% (4C) der Gesamtfläche des Zellkerns berechnet. Unter der Annahme, dass die Anzahl der Mikro-B-Chromosomen proportional zur relativen Größe der Flächen von Position 1 und 2 gleichmäßig verteilt ist, könnte man entsprechend 21% bzw. 28% der Mikro-B-Chromosomen in der Randzone (Position 2) und 79% bzw. 72% im restlichen Teil (Position 1) des Zellkerns

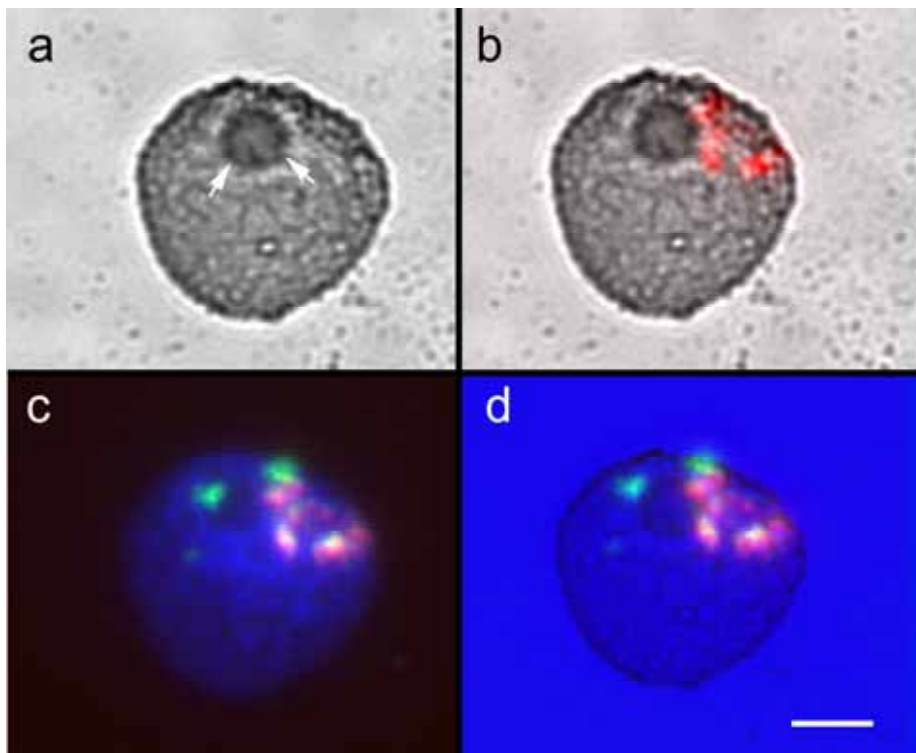
erwarten. Jedoch lagen 45% der Mikro-B-Chromosomen in den 2C-Kernen und 38% der Mikro-B-Chromosomen in den 4C-Kernen in der Position 2, also direkt am Rand des Zellkerns. In der Position 1 befanden sich 55% (2C) bzw. 62% (4C) der Mikro-B-Chromosomen (Abb. 22). Der Anteil der Mikro-B-Chromosomen in der Position 1 dürfte im Falle einer dreidimensionalen Auswertung jedoch eher noch kleiner werden, da bei dieser Betrachtung diese Mikro-B-Chromosomen durchaus auch am Rand des Zellkerns liegen könnten. Die Ursache für die Unterschiede in den 2C- und 4C-Kernen ist noch unbekannt. Es könnte sich dabei um eine dynamische Umstrukturierung der Interphaseanordnung während der G2-Phase handeln.



**Abb. 22:** Relative Häufigkeit (%) der Mikro-B-Chromosomen in Position 1 und 2 in jeweils 300 2C- und 4C-Kernen.

Die ähnliche räumliche Aufteilung von tierischen und pflanzlichen Zellkernen deutet auf eine evolutionäre Konservierung dieser nuklearen Eigenschaften (Mayr et al., 2003) hin und könnte somit auch für die Zellkerne von *B. dichromomatica* zutreffen.

Scheuermann et al. (2004) beobachteten in menschlichen Zellen, dass nichttranskribierende Sequenzen häufiger an der Peripherie des Nukleus (Position 2) liegen als transkriptionsaktive Gene. In Bezug auf die Mikro-B-Chromosomen könnte der Schluss gezogen werden, dass die Mikro-B-Chromosomen eher nichtaktive Sequenzen tragen, da im Interphasekern ein deutlich höherer Anteil von ihnen am Rand des Zellkerns lag, als bei zufallsgemäßer Verteilung zu erwarten wäre. Außerdem ist bei dreidimensionaler Auswertung zu vermuten, dass sich dieser Anteil noch erhöhen könnte.



**Abb. 23:** Relative Positionen der Mikro-B-Chromosomen, der 45S rDNA und des Nukleolus im Zellkern. Nach der Silberfärbung (a) wurde eine FISH (b-d) mit der B-spezifischen Probe Bdm29 (rot) und der 45S rDNA (grün) durchgeführt. Um den Nukleolus (Pfeile in a) und FISH-Signale zusammenzufügen, wurde das Bild mit den mit Silbernitrat gefärbten Kernen mit dem FISH-Bild kombiniert, um die Positionen der Mikro-B-Chromosomen (b) einschließlich der 45S rDNA (c) anzuzeigen. Der Zellkern in (c) wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

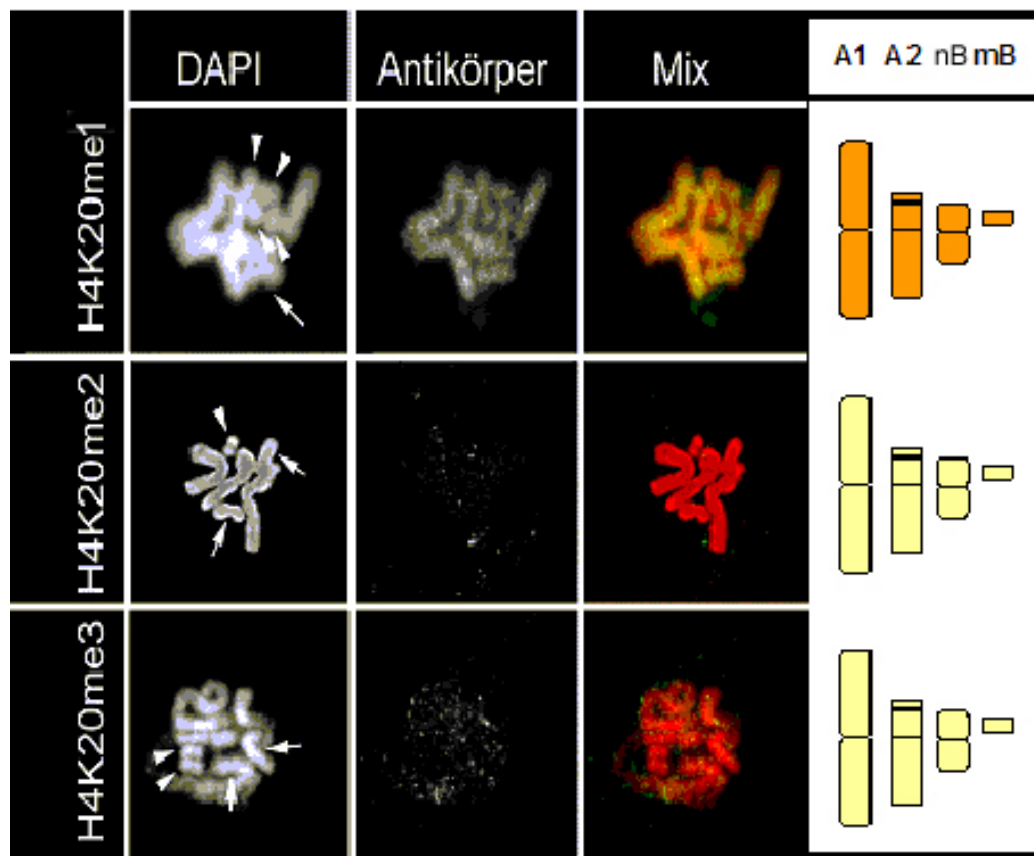
#### **4.4 Vergleichende Analyse der Histonmethylierung von A- und B-Chromosomen mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz**

Histonmethylierungen sind an die Genaktivierung bzw. -inaktivierung beteiligt. (Lachner und Jenuwein, 2002). Somit könnten Unterschiede in der Histonmethylierung zwischen A- und B-Chromosomen Hinweise auf eine unterschiedliche Transkriptionsaktivität der Gene auf den jeweiligen Chromosomen liefern. Aus diesem Grund wurde der Methylierungsstatus bestimmter Lysinreste der Histone H3 und H4 in A- und B-Chromosomen geprüft. Während die H3-Lysin-4-Methylierungen (H3K4me) mit einer Aktivierung der Gene in Verbindung gebracht werden und in Eukaryoten hoch konserviert sind, gelten die Methylierungen an H3-Lysin 9 (H3K9me), H3-Lysin 27 (H3K27me) und H4-Lysin 20 (H4K20me) als variabler (Fuchs et al., 2006). Zur Untersuchung des Methylierungsstatus der A- und B-Chromosomen wurde die indirekte Immunfluoreszenz mit verschiedenen Antikörpern, die zwischen Mono-, Di- und Trimethylierungen (me1, me2, me3) unterscheiden, an den Positionen K4, K9 und K27 bei Histon H3 und K20 bei Histon H4 genutzt (Abb. 24; 25; Tab. 3). Die euchromatinspezifischen Mono-, Di- und Trimethylierungen an H3K4 ergaben für die A-Chromosomen eine disperse Markierung mit Ausnahme des Perizentromers und einer heterochromatischen Region. Während an den Standard-B-Chromosomen noch eine sehr schwache Markierung mit den Antikörpern für die drei Methylierungstypen von H3K4 erfolgte, zeigte sich an den Mikro-B-Chromosomen nur noch bei H3K4me1 eine schwache disperse Markierung. Keine Di- und Trimethylierungen wurden bei diesem B-Chromosomentyp nachgewiesen. Die unterschiedlichen Immunmarkierungen von A- und B-Chromosomen weisen auf eine unterschiedliche Chromatinzusammensetzung beider Chromosomentypen hin (Abb. 25).

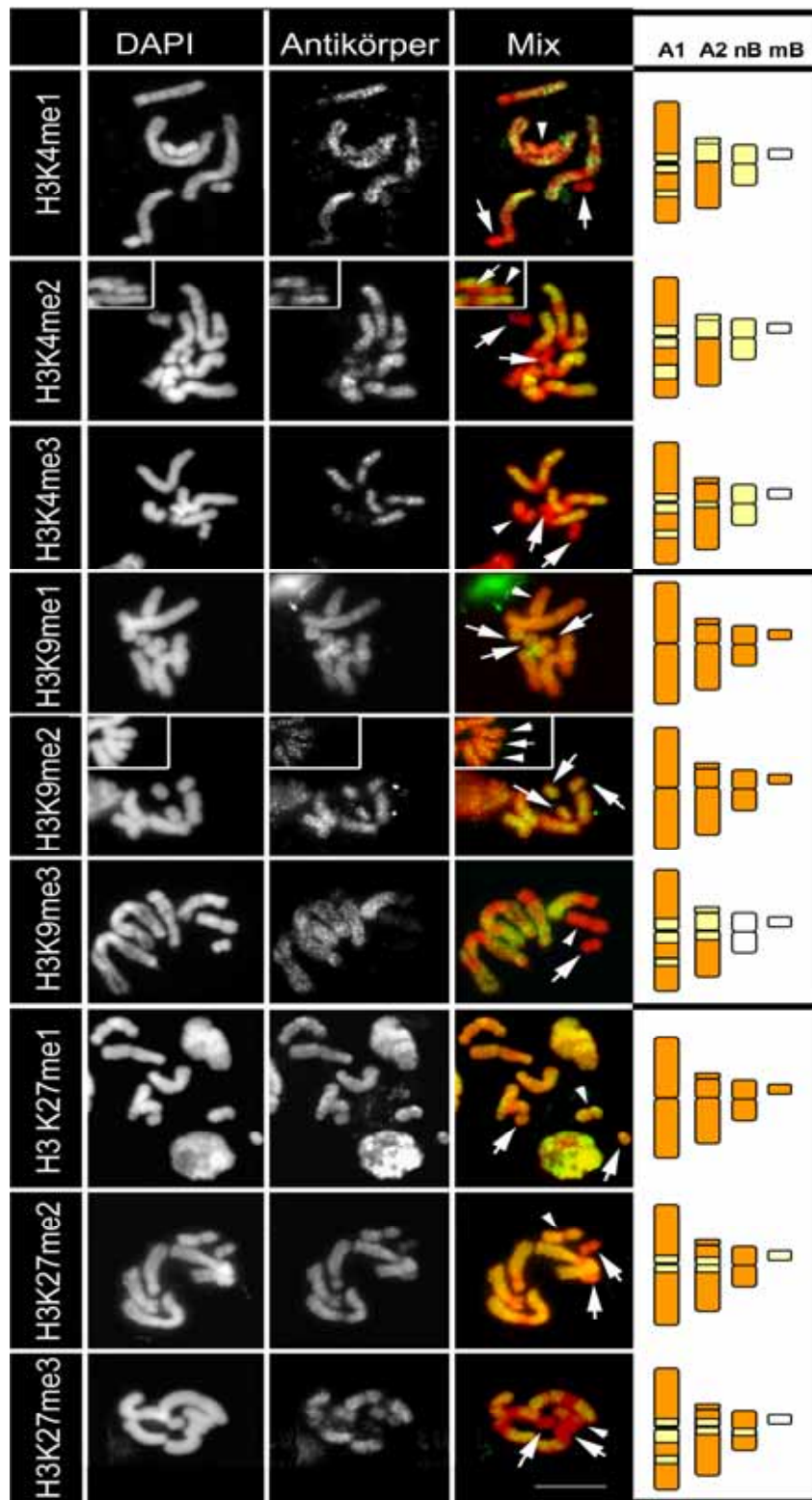
Eine einheitliche disperse Verteilung der Mono- und Dimethylierungen an H3K9 wurde auf den A-Chromosomen deutlich. Dieses Ergebnis korreliert mit den Resultaten von Houben et al. (2003), wo festgestellt wurde, dass die Verteilung der H3K9-Dimethylierungen von der Genomgröße abhängt. Bei der Trimethylierung der A-Chromosomen zeigte sich wieder eine disperse Markierung mit Ausnahme des Perizentromers. Auf den B-Chromosomen zeigten H3K9me1 und H3K9me2 die gleiche disperse Verteilung wie auf den A-Chromosomen, während H3K9me3 auf den B-Chromosomen eine bedeutend schwächere Markierung als auf den A-

Chromosomen aufwies (Abb. 25). In *A. thaliana* (Naumann et al., 2005) und in *H. vulgare* erwiesen sich die Trimethylierungen an H3K9 als typische Marker für Euchromatin (Fuchs et al., 2006). Die Markierung von H3K9me3 bei den A-Chromosomen von *B. dichromosomatica* deutet ebenfalls auf eine euchromatische Kennzeichnung. Ähnlich kann auch die Situation für H3K27me3 betrachtet werden, da diese Methylierung in *A. thaliana* und *H. vulgare* ebenfalls als Marker für Euchromatin detektiert wurde (Fuchs et al., 2006) und in *B. dichromosomatica* Unterschiede dieser Methylierung zwischen den A- und B-Chromosomen zu erkennen waren. Während die A- und die Standard-B-Chromosomen in H3K27me1 und H3K27me2 und Mikro-B-Chromosomen in H3K27me1 eine einheitliche disperse Markierung zeigten, erwies sich die H3K27me2-Markierung auf den Mikro-B-Chromosomen als erheblich schwächer. Die H3K27me3-Markierung auf den A- und Standard-B-Chromosomen zeigte eine gleiche disperse Verteilung, die das Perizentromer als heterochromatische Region auslöst, was auf eine euchromatische Markierung ähnlich wie in *A. thaliana* und in *H. vulgare* schließen lässt. Die Mikro-B-Chromosomen blieben für die H3K27me3 unmarkiert, was wieder die genetische Inaktivität bestätigen könnte (Abb. 25).

Auf allen Chromosomentypen resultierte der Nachweis von H4K20me1 in einer dispersen Markierung, während H4K20me2 und H4K20me3 sehr schwach und kaum sichtbar war (Abb. 24). Insgesamt unterstützen die Resultate der indirekten Immunfluoreszenz die Hypothese, dass die B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* genetisch inaktiv sind.



**Abb. 24:** Analyse von chromosomalen Histon-H4K20-Methylierungsmarkierungen. Metaphasezellen von *B. dichromosomatica* mit Standard-B-Chromosomen (Pfeile) und Mikro-B-Chromosomen (einzelne mBs bilden metazentrische Isochromosomen) (Pfeilköpfe) nach der Immunfärbung mit Antikörpern, spezifisch für H4K20me1,2,3. Das Ideogramm zeigt die Verteilung der Immunsignale auf den A-Chromosomen (A1, A2), Standard-B-Chromosomen (nB) und Mikro-B-Chromosomen (mB).



**Abb. 25:** Vergleichende Analyse von chromosomalen Histon-H3-Methylierungsmarkierungen. Metaphasezellen von *B. dichromosomatica* mit Standard-B-Chromosomen (Pfeilköpfe) und Mikro-B-Chromosomen (einzelne mBs bilden metazentrische Isochromosomen) (Pfeile) nach der Immunfärbung mit Antikörpern, spezifisch für H3K4me1,2,3; H3K9me1,2,3 und H3K27me1,2,3. Das Ideogramm zeigt die Verteilung der Immunsignale auf den A-chromosomen (A1, A2), Standard-B-Chromosomen (nB) und Mikro-B-Chromosomen (mB).

<b>Methylierung</b>	<b>A-Chromosomen</b>	<b>nB-Chromosomen</b>	<b>mB-Chromosomen</b>
<b>H3K4me1</b>	geclustert	schwach dispers	sehr schwach dispers
<b>H3K4me2</b>	geclustert	schwach dispers	unmarkiert
<b>H3K4me3</b>	geclustert	schwach dispers	unmarkiert
<b>H3K9me1</b>	dispers	dispers	dispers
<b>H3K9me2</b>	dispers	dispers	dispers
<b>H3K9me3</b>	dispers	sehr schwach dispers	unmarkiert
<b>H3K27me1</b>	dispers	dispers	dispers
<b>H3K27me2</b>	dispers außer Perizentromer	dispers	sehr schwach dispers
<b>H3K27me3</b>	dispers außer Perizentromer	dispers außer Perizentromer	unmarkiert
<b>H4K20me1</b>	dispers	dispers	dispers
<b>H4K20me2</b>	sehr schwach dispers	sehr schwach dispers	sehr schwach dispers
<b>H4K20me3</b>	sehr schwach dispers	sehr schwach dispers	sehr schwach dispers

**Tab.3:** Verteilung der methylierten Histon-H3- und Histon-H4-Markierungen in A-Chromosomen, Standard-B-Chromosomen (nB) und Mikro-B-Chromosomen (mB).



## 5 Diskussion

Obwohl B-Chromosomen im allgemeinen als transkriptionsinaktiv gelten, tragen eine Anzahl von B-Chromosomen in verschiedenen Pflanzen- und Tierarten 45S rDNA-Gene (Green, 1990), wie z. B. beschrieben für *C. capillaris* (Maluszynska und Schweizer, 1989), *Plantago lagopus* (Dhar et al., 2002), *Rattus rattus* (Stitou et al., 2000) und *T. kaykai* (van Vught et al., 2005). Es werden mehrere Erklärungen für die häufige Präsenz der rDNA auf den B-Chromosomen diskutiert.

Ihre Präsenz kann zufällig und ein Resultat interchromosomaler Transposition der rDNA-Sequenzen sein (Maluszynska und Schweizer, 1989; Beukeboom, 1994). Da die NORs relativ leicht mit der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und der Silberfärbung nachgewiesen werden können, wurden diese Untersuchungen oft zur Analyse von B-Chromosomen eingesetzt und somit entsprechend häufig nachgewiesen. Es ist durchaus denkbar, dass in Zukunft noch andere genkodierende Sequenzen auf B-Chromosomen nachgewiesen werden.

Eine andere Möglichkeit ist, dass der Ursprung eines rDNA tragenden B-Chromosomes aus einem A-Chromosomenfragment, das rDNA-Gene enthielt, hervorging und nach der Fragmentation eine massive Akkumulation von rDNA-Sequenzen erfolgte, wie es für *P. lagopus* vorgeschlagen wurde, bei der neben der 45S rDNA eine massive Akkumulation von 5S rDNA auf den B-Chromosomen nachgewiesen wurde (Dhar et al., 2002). Andererseits kann ein rDNA-Transkriptionseignis selbst Chromosomenbrüche produzieren, die eine Rolle beim Ursprung der B-Chromosomen spielen können (Houben et al., 1997b).

### 5.1 Ursprung der 45S rDNA-Sequenzen der B-Chromosomen

*B. dichromosomatica* Cytodem A2 besitzt 45S rDNA am kurzen Arm des A-Chromosoms 2 und des Standard-B-Chromosoms, in geringen Kopienzahlen im Perizentromer des Standard-B-Chromosoms sowie am nichtzentromerischen Ende der Mikro-B-Chromosomen (Houben et al., 1997b) (Abb. 6, 7). Cytodem A1 hat 45S rDNA auf dem A-Chromosom 1 und am Ende des kurzen Arms des Standard-B-Chromosoms (Donald et al., 1995) sowie in geringen Kopienzahlen im Perizentromer des Standard- B-Chromosoms.

### 5.1.1 Ursprung B-spezifischer 45S rDNA durch interspezifische Hybridisierung

Während die kodierenden 45S rDNA-Einheiten hoch konserviert sind (Walsh und Stephan, 2001), zeigen die ITS-Sequenzen oft ein hohes Niveau an Sequenzvariabilität zwischen eng verwandten Arten und sind somit gut geeignet für phylogenetische Studien (Baldwin, 1992).

Der Vergleich der ITS2-Sequenzen der A- und Standard-B- und Mikro-B-Chromosomen im Cytodem A2 zeigte eine relativ hohe Ähnlichkeit dieser Sequenzen zueinander. Das deutet darauf hin, dass die 45S rDNA beider B-Chromosomentypen von der 45S rDNA der A-Chromosomen abstammt oder alle Chromosomentypen einen gemeinsamen Vorgänger haben. Unter den Variationen zwischen den ITS2-Sequenzen existieren zwei markante Unterschiede zwischen den ITS2-Sequenzen der A- und B-Chromosomen an Position 142 und 175 (Abb. 10). Diese Unterschiede wurden von Donald et al. (1997) auch im Cytodem A1 in den Standard-B-Chromosomen gefunden, was auf einen gemeinsamen Ursprung der Standard-B-Chromosomen beider Cytochrome hinweist. Das Vorhandensein des *Sfc1*-Restriktionsortes an Position 142 in den ITS2-Sequenzen der Standard-B-Chromosomen der Cytochrome A1 und A2, aller *B. lineariloba*-Zygotypen und von *B. breviscapis* weist darauf hin, dass *B. lineariloba* und *B. breviscapis* an der Entstehung der B-Chromosomen beteiligt gewesen sein könnte oder alle drei Arten einen gemeinsamen evolutionären Vorgänger haben. *B. breviscapis* und *B. lineariloba* E wachsen in derselben geographischen Region. Letztere hat eine geographische Überlappung mit *B. lineariloba* B und diese mit den *B. dichromosomatica*-Cytochromen A1, A2, A4 und *B. lineariloba* C (Kyhos et al., 1977). Dieser geographische Zusammenhang könnte eine Begründung für das Vorhandensein des *Sfc1*-Ortes in den drei verwandten Arten sein, z. B. durch das Auftreten von interspezifischen Hybridisierungen in diesen Regionen. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die rDNA der B-Chromosomen des *B. dichromosomatica*-Cytochroms A3, das 1000 km entfernt von den anderen *B. dichromosomatica*-Cytochromen und dem *B. lineariloba*-Komplex wächst, diesen speziellen Restriktionsort nicht besitzt.

Leach et al. (2004) postuliert, dass die B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* von *B. lineariloba* C (2n=16) abstammen könnten. Sie führt dafür folgende Indizien auf. Erstens: Es gibt eine erhebliche Überlappung der Verbreitung dieser beiden

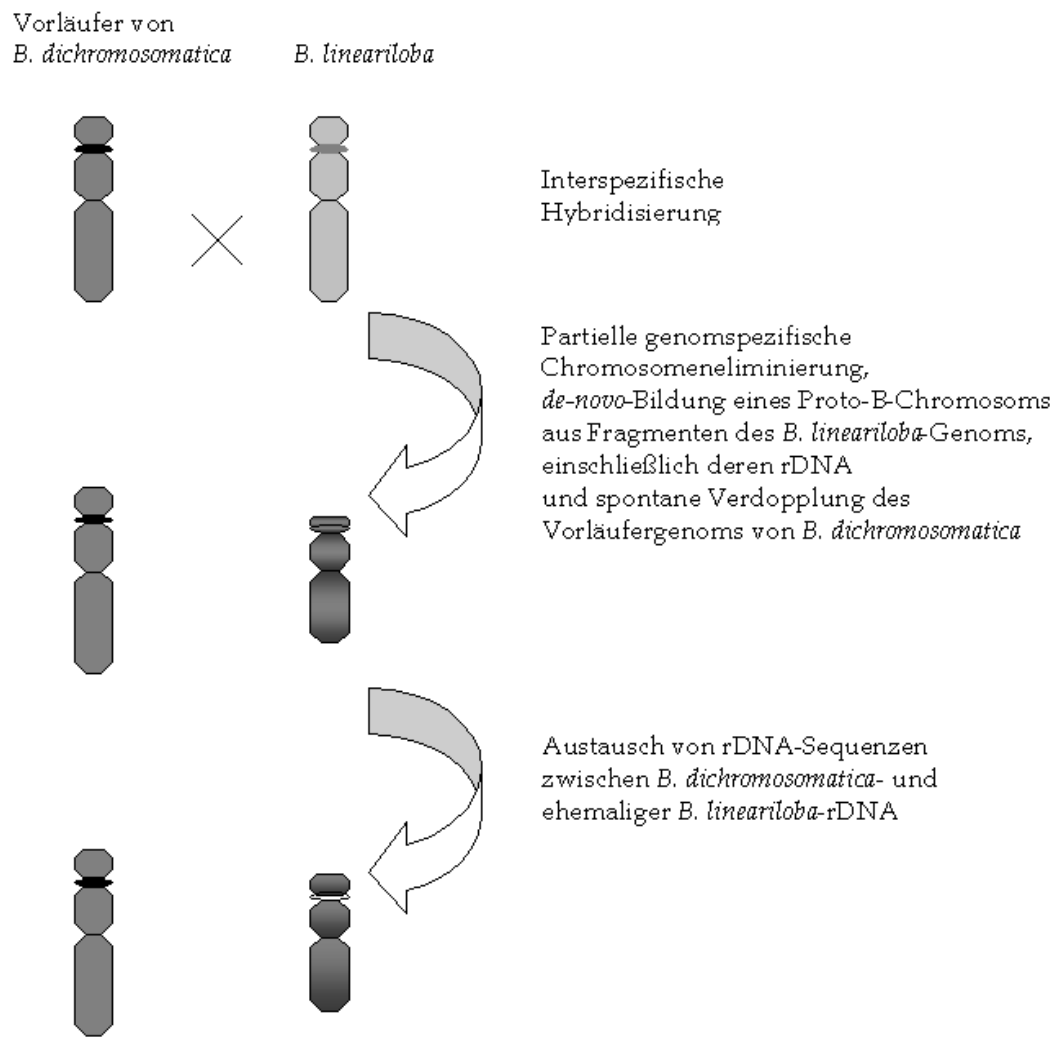
Arten und natürliche Hybride in den Populationen (Smith-White und Carter, 1970). Zweitens: Das Auftreten von vielen zytologischen Varianten in *B. lineariloba* C inklusive einer Variante mit einem kleinen Chromosom (fast identisch mit der Größe des Standard-B-Chromosoms), das eine NOR besitzt (Watanabe et al., 1985). Drittens: In *B. dichromosomatica* treten beträchtliche Chromosomenvariationen auf, die phänotypisch ununterscheidbar voneinander waren. Viertens: Molekulare Analysen haben gezeigt, dass *B. lineariloba* C ein Bd49-ähnliches Repeat besitzt, das für die Standard-B-Chromosomen spezifisch ist und auf den A-Chromosomen von *B. dichromosomatica* nicht nachweisbar ist.

Andererseits ist der Nukleotidaustausch an der ITS2-Sequenzposition 175 in den B-Chromosomen nicht in anderen *Brachycome*-Arten zu finden, so dass möglicherweise eine bisher unbekannte Art als gemeinsamer Vorfahre bei der Entstehung B-Chromosomen involviert war. Eine interspezifische Hybridisierung zwischen eng verwandten Arten könnte eine mögliche Ursache für die Entstehung der B-Chromosomen sein (Camacho et al., 2000). Ein experimenteller Nachweis für die Übertragung von Fremd-DNA innerhalb eng verwandter Arten durch Art- und Gattungskreuzung gelang mit den zwei Pflanzenarten *C. gigantea* und *C. aquatica* (Sapre und Deshpande, 1987). Dabei wurden Chromosomen oder Chromosomenfragmente von *C. gigantea* durch spontane interspezifische Hybridisierung in das Genom von *C. aquatica* eingefügt, die dann Eigenschaften von B-Chromosomen aufwiesen. Ein Hybridursprung für das B-Chromosom in der parasitären Wespe *Nasonia vitripennis* durch Hybridisierung dieser Art mit einer Wespe der eng verwandten Gattung *Trichomalopsis* wurde von McAllister und Werren (1997) postuliert. Perfectti und Werren (2001) unterstützten experimentell das interspezifische Hybridisierungsmodell für den B-Chromosomen-Ursprung durch Introgression einer Chromosomenregion von *N. giraulti* in *N. vitripennis*. Ein weiteres Beispiel für die Entstehung überzähliger Chromosomen durch interspezifische Hybridisierung ist die Kombination des Amazonenkärpfings *Poecilia formosa* mit der *Poecilia*-Zuchtform „Black Molly“, bei der durch paternale Introgression kleine zentromertragende überzählige Chromosomen entstanden (McVean, 1995; Scharl et al., 1995).

Die Abb. 26 zeigt ein Modell zum möglichen Ursprung der 45S rDNA der B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* durch interspezifische Hybridisierung. Danach könnte es nach einem Hybridisierungsereignis zwischen

*B. dichromosomatica* und *B. lineariloba* zu einer partiellen genomspezifischen Chromosomeneliminierung von *B. lineariloba*-Chromatin gekommen sein. Die daraus entstandenen Chromosomenfragmente könnten die Grundlage für die Entstehung eines B-Chromosoms gebildet haben. Durch Rekombination zwischen elterlichen 45S rDNA-Sequenzen könnte sich der 45S rDNA-Sequenzpolymorphismus der B-Chromosomen herausgebildet haben.

Bei einer interspezifischen Befruchtung werden zwei unterschiedliche elterliche Genome in einem Nukleus zusammengefügt. Diese neue genomische Konstitution, die einen intergenomischen Konflikt darstellt, kann zu genetischen und epigenetischen Umorganisationen der Genome führen (Riddle und Birchler, 2003). Obwohl in den meisten Fällen die elterlichen Genome nach einer erfolgreichen Befruchtung kombiniert bleiben, kann es zu einer Eliminierung zahlreicher DNA-Sequenzen bzw. ganzer elterlicher Genome kommen (Feldman et al., 1997). Eine selektive Eliminierung von elterlichen Chromosomen während der Entwicklung von Hybridembryos aus Kreuzungen von Weizen mit Hirse wurde von Gernand et al. (2005) untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass die selektive Eliminierung von Hirsechromosomen aus folgenden aufeinanderfolgenden Schritten besteht: elterliche Chromatinseparation in der Interphase, Mikrokernformation, Heterochromatisierung und schließlich die DNA-Fragmentierung des Mikrokernchromatins. Wenn ein heterochromatisiertes Chromosomenfragment der Eliminierung entgeht und erhalten bleibt, könnte eine anschließende spontane Chromosomenverdopplung eine ideale Voraussetzung für die *de-novo*-Bildung eines B-Chromosoms sein (Gernand et al., 2005). Dieses Szenario ist durchaus für Hybride aus *B. dichromosomatica* und *B. lineariloba* vorstellbar, wobei die entstandenen Chromosomenfragmente die Voraussetzung für die Entstehung von B-Chromosomen sein könnten. Die vorherige Heterochromatisierung des Chromatins könnte für die Transkriptionsinaktivität der 45S rDNA der entstandenen B-Chromosomen verantwortlich sein.

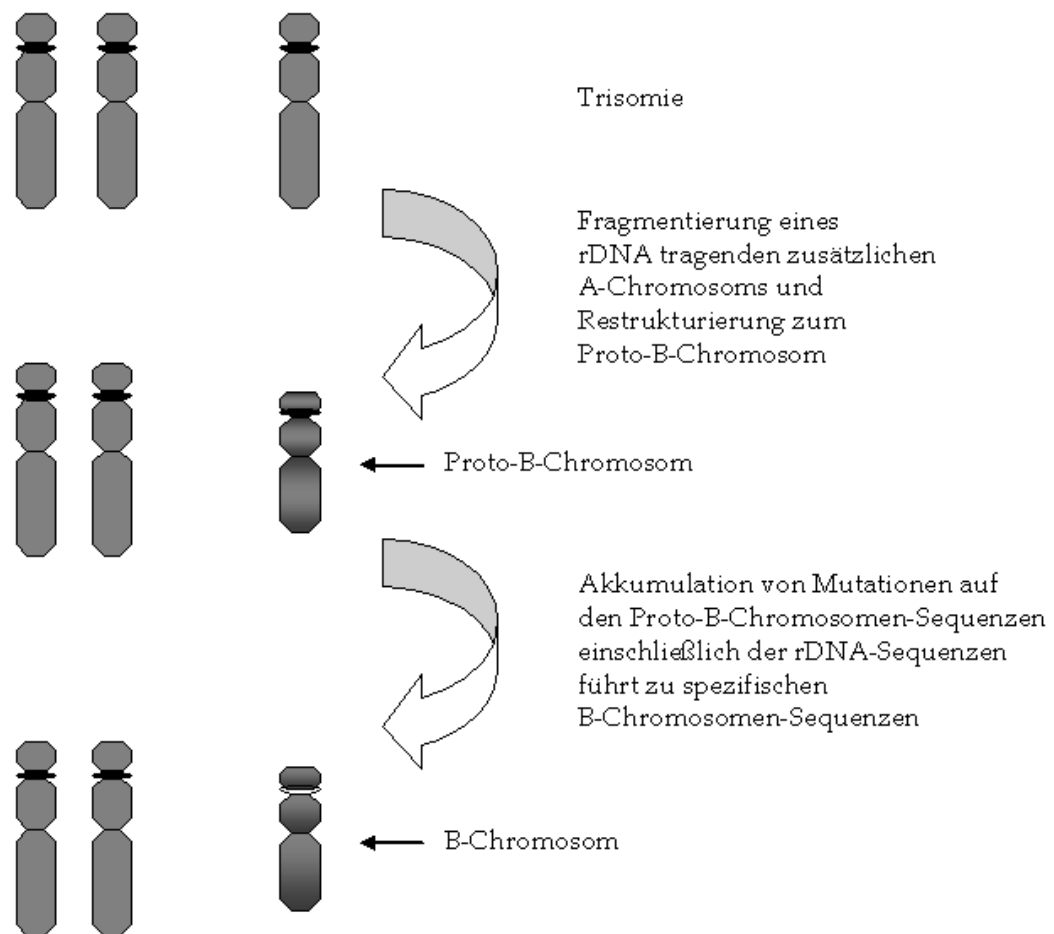


**Abb. 26:** Modell zur interspezifischen Hybridisierung als Ursprung B-spezifischer 45S rDNA-Sequenzen.

### 5.1.2 Ursprung B-spezifischer 45S rDNA durch Akkumulation von Mutationen

Eine andere Möglichkeit wäre, dass Mutationen für die Variationen auf den ITS2-Sequenzen der B-Chromosomen verantwortlich sind. Die größere Variationsbreite in den ITS2-Sequenzen der B-Chromosomen im Vergleich zu den ITS2-Sequenzen der A-Chromosomen deutet darauf hin, dass eine Akkumulation von Mutationen verstärkt auf den B-Chromosomen auftritt. Das Akkumulieren von Mutationen auf B-Chromosomen in einem Prozess analog zu „Muller’s Ratchet“ macht Green (1990) für die Evolution der B-Chromosomen verantwortlich. „Muller’s Ratchet“ bedeutet, dass in asexuellen Populationen eine Art von Sperrmechanismus (ähnlich einer Ratsche) eingebaut ist, so dass nie irgendeine ihrer Linien eine Mutationsanreicherung erhalten kann, die kleiner ist als in einer schon gegenwärtig existierenden gering angereicherten Linie. Letztere kann noch stärker durch weitere Mutationen belastet werden (Muller, 1964). Rekombinationen, wie es bei sexualen Populationen der Fall ist, würden die Belastungen der ungünstigen Mutationen verringern (Felsenstein, 1974). Da eine der Haupteigenschaften von B-Chromosomen ist, nie mit den Chromosomen des A-Komplementes zu paaren (Beukeboom, 1994), ist ein Ausgleich von Mutationen durch Rekombination nicht gegeben, so dass die B-Chromosomen ebenfalls dem „Muller’s Ratchet“-Mechanismus unterliegen könnten. Dieser Mechanismus wird auch bei der Degeneration der tierischen und pflanzlichen Sexchromosomen in Erwägung gezogen. Durch die Abwesenheit von Rekombination bei den Y-Chromosomen könnte der „Muller’s Ratchet“-Mechanismus so zu einer kumulativen Schädigung der Genfunktion an Orten verstreut über ein Proto-Y-Chromosom führen (Charlesworth und Charlesworth, 2000; Charlesworth, 2002). Es ist denkbar, dass die B-Chromosomen-lokalisierte 45S rDNA ebenfalls dem „Muller’s-Ratchet“-Mechanismus unterliegt. Aufgrund der Anreicherung von Mutationen erfolgte die Inaktivierung der rDNA. Inaktive rDNA-Sequenzen würden somit nicht der Genkonversation unterliegen (Lim et al., 2000) und von denen der A-Chromosomen abweichen. Das Auffinden von inaktiven ribosomalen Genen in den B-Chromosomen von *R. rattus* wird damit erklärt, dass sich im Laufe der Evolution repetitive Elemente auf den B-Chromosomen angereichert haben. Die ribosomale DNA wurde dadurch über das gesamte Chromosom verteilt, heterochromatisiert und damit inaktiviert (Stitou et al., 2000).

Abb. 27 zeigt ein Modell für die mögliche Entstehung B-Chromosomen-spezifischer ITS2-Sequenzen als Folge der Akkumulation von Mutationen auf den B-Chromosomen.



**Abb. 27:** Modell zur Akkumulation von Mutationen auf den B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* als Ursprung B-spezifischer 45S rDNA-Sequenzen

### 5.1.3 Erfolgte eine Homogenisierung der A- und B-Chromosomen-lokalisierten ITS2-Sequenzen?

Generell besitzen diploide Genome sequenzidentische rDNA-Repeateinheiten. Der Prozess, der zu einer Homogenisierung der rDNA-Sequenzen führt, wird als konzertierte Evolution beschrieben (Dover, 1982; Elder und Turner, 1995). Konzertierte Evolution bedeutet, dass, wenn man die Mitglieder einer repetitiven Sequenzfamilie miteinander vergleicht, die Ähnlichkeit der Sequenzen innerhalb einer Art höher ist als zwischen den verschiedenen Arten. Das heißt, dass die Mitglieder einer repetitiven Familie sich nicht unabhängig voneinander entwickeln (Liao, 1999). Mechanismen wie gerichtete Genkonversion und nichtreziproker Austausch während der Meiose ermöglichen die Homogenisierung von Repeateinheiten innerhalb von Individuen und Populationen (Dover, 1982; Hillis et al., 1991). Das Auffinden von mehreren Typen von B-Chromosomen-ITS2-Sequenzen im Cytodem A2 könnte bedeuten, dass die 45S rDNA der B-Chromosomen nicht der Sequenzhomogenisierung unterliegt oder diese nur unvollständig erfolgt ist. Da die ITS2-Sequenz der A-Chromosomen auch auf den B-Chromosomen zu finden ist, lässt sich vermuten, dass eine Homogenisierung zwischen den beiden Chromosomentypen noch stattfindet. Auch die relativ hohe Ähnlichkeit der ITS2-Sequenzen innerhalb der einzelnen Chromosomentypen könnte dafür sprechen, dass eine Homogenisierung der Sequenzen noch auftritt. Die Tatsache, dass im Cytodem A1 auf allen ITS2-Sequenzen von isolierten Standard-B-Chromosomen der *Sfc1*-Ort zu finden war (Donald et al., 1997), könnte zeigen, dass in diesem Fall eine B-Chromosomen-spezifische Homogenisierung der ITS2-Sequenz vollständig stattfand. Andererseits erfolgten diese Untersuchungen an nur sehr wenigen Sequenzen, so dass es durchaus möglich ist, dass ein Teil der bisher nicht analysierten ITS2-Sequenzen der B-Chromosomen des Cytodems A1 keinen *Sfc1*-Restriktionsort besitzt. Ein rDNA-Polymorphismus innerhalb von Individuen kann auftreten, wenn der Prozess der konzertierten Evolution nicht schnell genug ist, die Repeats in Regionen hoher Mutationsraten oder früherer interspezifischer Hybridisierungen zu homogenisieren (Campbell et al., 1997). Für *Paeonia* wurde von Sang et al. (1995) berichtet, dass eine Verlangsamung der konzertierten Evolution in Pflanzen mit Hybridursprung durch verlängerte Generationszeiten infolge vegetativer Vermehrung beobachtet wurde. In der parasitoiden Wespe *T. kaykai* wurden zusätzlich zu der ITS2-Sequenz der



A-Chromosomen noch vier weitere unterschiedliche ITS2-Sequenzen auf den B-Chromosomen nachgewiesen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Sequenzveränderungen der ITS2-Sequenzen auf den B-Chromosomen schneller erfolgen als ihre Homogenisierung (van Vught, 2005). Da der Standard-B-spezifische *Sfc1*-Restriktionsort in *B. dichromosomatica* in nur sehr geringer Kopienzahl auch auf den ITS2-Sequenzen der A-Chromosomen in nur einer Pflanze gefunden wurde, kann man annehmen, dass die Sequenzhomogenisierung auf diesen Chromosomen effizienter stattfindet als auf den B-Chromosomen. Sequenzunterschiede können durch die Aufhebung des Zwangs zur konzertierten Evolution durch die fehlende Paarung der B-Chromosomen mit den A-Chromosomen auftreten, wie es für *C. capillaris* vermutet wird. In *C. capillaris* wurden zusätzlich zu den rDNA-ITS2-Sequenzen der A-Chromosomen zwei unterschiedliche ITS2-Sequenzen auf den B-Chromosomen gefunden (Leach et al., 2005). Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die ITS2-Sequenzunterschiede zwischen A- und B-Chromosomen in *B. dichromosomatica*. Möglicherweise ist die fehlende Paarung der B-Chromosomen mit den A-Chromosomen die Ursache der fehlenden oder zumindest verzögerten Homogenisierung der ITS2-Sequenzen in den B-Chromosomen von *B. dichromosomatica*. Rekombinationsereignisse werden dadurch unterbunden und können auf die Sequenzen nicht regulierend einwirken. Auch Ereignisse, die die Rekombination verzögern oder verhindern, wie z. B. die DNA-Methylierung, könnten dafür verantwortlich gemacht werden. So berichten Maloisel und Rossignol (1998), dass die Methylierung der DNA die meiotische Rekombination in dem Pilz *Ascobolus* hemmt. Lim et al. (2000) untersuchte die unvollständige Genkonversion in *Nicotianum tabacum* und die Abwesenheit der rDNA-Sequenzhomogenisierung in *N. sylvestris*. Er schlägt vor, dass erst die Kombination aus Dekondensation, Untermethylierung und Nukleolusassoziation, gekoppelt mit der tandemartig organisierten Natur der rDNA, die rRNA-Geneinheiten für die Genkonversion verfügbar machen und dass somit Genkonversion nur in transkriptionsaktiven rRNA-Geneinheiten auftreten kann. Die Untersuchungen der Transkriptionsaktivität der 45S rDNA der Mikro-B-Chromosomen erbrachten keinen direkten molekularen Beweis, dass diese transkriptionsaktiv sind. 70% der untersuchten Mikro-B-Chromosomen assoziierten nicht mit dem Nukleolus im Interphasekern. Bei der Annahme, dass Transkriptionsaktivität bei einer Assoziation der Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus vorliegt, kann man davon ausgehen, dass ein

Großteil der 45S rDNA auf den Mikro-B-Chromosomen nicht aktiv ist und deshalb keine Homogenisierung stattfand. Auch in der oben genannten Untersuchung an der Wespe *T. kaykai* zeigte nur die ITS2-Sequenz, die homolog zu der auf den A-Chromosomen war, Transkriptionsaktivität, während die restlichen vier multiplen ITS2-Sequenzen nicht transkribierten und somit auch keine Sequenzhomogenisierung zeigten (van Vught, 2005). Donald et al. (1995) zeigte unter Anwendung von methylierungssensiblen Restriktionsenzymen und Southern-Hybridisierungen, dass die Methylierungsmuster der 45S rDNA von A- und B-Chromosomen ununterscheidbar waren. Deshalb ist es denkbar, dass andere Mechanismen, wie die Histonmodifizierungen, die rRNA-Gene auf den B-Chromosomen inaktivieren und die Sequenzhomogenisierung behindern. So weisen die untersuchten Histonmodifizierungen z. B. eine unterschiedliche Methylierung der A- und B-Chromosomen von Histon H3 Lysin 4 auf. Da die Methylierung von Histon H3 Lysin 4 als transkriptionsaktivierend gilt und die B-Chromosomen eine sehr geringe bzw. keine Methylierung an dieser Position aufzeigen, ist eine Transkriptionsinaktivität der B-Chromosomen anzunehmen. Eine starke Kondensation der NOR-Regionen der Mikro-B-Chromosomen wurden von Houben et al. (2001b) mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Dieser hohe Kondensationsgrad der NOR-Region auf den Mikro-B-Chromosomen könnte ebenfalls einen Grund für die fehlende Sequenzhomogenisierung darstellen und ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die rDNA-Sequenzen der Mikro-B-Chromosomen inaktiv sind. Andererseits wurde der spezifische *Sfc1*-Ort der Standard-B-Chromosomen nicht auf den ITS2-Sequenzen der Mikro-B-Chromosomen gefunden, so dass zumindest in diesem Bereich eine Homogenisierung mit der A-Chromosomen-spezifischen ITS2-Sequenz aufgetreten sein könnte.

#### **5.1.4 Phylogenetische Analyse der B-Chromosomen**

Die phylogenetische Analyse der ITS2-Sequenzen von 26 *Brachycome*-Arten zeigte eine deutliche Unterteilung der Arten in zwei Hauptgruppen. Dabei umfasst die erste Gruppe *B. ciliaris*, *B. rigidula*, *B. lineariloba* B, C und E, *B. breviscapis* und *B. dichromosomatica* Cytodeme A1 - A4 und die zweite Gruppe die restlichen untersuchten *Brachycome*-Arten. Die drei Zytotypen von *B. lineariloba* und *B. breviscapis* bilden in der ersten Hauptgruppe eine Untergruppe, die sich aus

der anderen Untergruppe mit den vier Cytodemen von *B. dichromosomatica* herausbildet. Die höhere Chromosomenanzahl der *B. lineariloba* Zytotypen B ( $2n=12$ ), C ( $2n=16$ ) und E ( $2n=10$ ) könnte durch aufeinander folgende Kreuzungen mit einem *B. dichromosomatica* ähnlichen Vorgänger entstanden sein (Watanabe und Smith-White, 1987). Diese Vorstellung beruht auf Ähnlichkeiten zwischen der Größe und dem mitotischen Kondensationsverhalten der Chromosomen von *B. dichromosomatica* verglichen mit den kleineren Chromosomen der *B. lineariloba*-Zytotypen E, B und C, die anscheinend in dysploiden Serien hinzugefügt wurden. Im Gegensatz dazu könnte diese Chromosomenzahlveränderung auch durch schrittweise Chromosomenzahlreduktion von  $2n=16$  abwärts erfolgt sein (Field et al., 2006). Die ITS2-Sequenzen der Standard-B-Chromosomen der Cytodeme A1 und A2 und der Mikro-B-Chromosomen des Cytodems A2 sind in der Untergruppe der vier Cytodeme von *B. dichromosomatica* unregelmäßig verteilt und bilden keine eigene Gruppe. Dies weist auf den polymorphen Charakter beider B-Chromosomen-Typen hin und ist auch ein weiterer Hinweis darauf, dass diese von den A-Chromosomen abstammen könnten oder beide Chromosomentypen einen gemeinsamen Vorgänger haben könnten. Dass die B-Chromosomen phylogenetisch keine eigene Gruppe bilden und somit dem 45S rDNA-Typ der A-Chromosomen sehr ähnlich sind, unterstützt die Hypothese von Houben et al. (1999), die einen monophyletischen Ursprung der B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* favorisieren. Die phylogenetische Nähe der ITS2-Sequenzen der B-Chromosomen mit denen des *B. lineariloba*-Komplexes deutet auf einen gemeinsamen Vorfahren beider Arten hin.

## 5.2 Transkriptionsaktivität der B-Chromosomen

Die durchgeführten Analysen der B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* sprechen dafür, dass die B-Chromosomen nicht oder nur im geringen Maße transkriptionsaktiv sind. Obwohl die B-Chromosomen generell als genetisch inaktiv gelten, gab es in jüngster Zeit Beweise für die Transkriptionsaktivität von rRNA-Genen auf B-Chromosomen einzelner Arten. So wurde für *C. capillaris* die Transkriptionsaktivität von zwei B-Chromosomen-spezifischen rRNA-Genen nachgewiesen, die wesentliche Unterschiede in der Sequenz von denen der A-Chromosomen-lokalisierten rRNA-Gene zeigten (Leach et al., 2005). Bei *T. kaykai* wurde eine teilweise B-Chromosomen-spezifische rDNA-

Transkriptionsaktivität nachgewiesen. Dabei handelte es sich um rDNA-Sequenzen, die auch sequenzidentisch auf den A-Chromosomen lokalisiert sind (van Vught, 2005).

Die Silberfärbung zum Nachweis aktiver rRNA-Gene gilt als akzeptierte Methode, um aktive NORs zu detektieren, da mit dieser Methode Proteine nachgewiesen werden, die vorher an der Synthese von rRNA beteiligt waren (Hubbell, 1985). In *B. dichromosomatica* war es nicht möglich, die NORs der A- und B-Chromosomen mit Hilfe der Silberfärbung anzufärben, obwohl die Nukleoli im Interphasekern gut mit dieser Technik zu detektieren waren (Abb. 16) (Donald et al., 1997). Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zeigte die Präsenz von rDNA auf den Standard-B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* im Cytodem A1 (Donald et al., 1995) und im Cytodem A2 (Houben et al., 2001b). Molekulare Experimente, die die RT-PCR mit Primern spezifisch für die B-Chromosomen-rDNA nutzten, zeigten, dass die B-Chromosomen des Cytodems A1 von *B. dichromosomatica* nicht transkriptionsaktiv sind (Donald et al., 1997). Im Cytodem A2 war es nicht möglich, die rDNA-Sequenzen der A- und B-Chromosomen mit Hilfe der RT-PCR eindeutig voneinander zu unterscheiden. Weitere Methoden (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, indirekte Immunfluoreszenz-Markierung) wurden verwendet, um eindeutigere Schlüsse auf die Transkriptionsaktivität der B-Chromosomen, insbesondere der rDNA auf den B-Chromosomen des Cytodems A2 von *B. dichromosomatica*, ziehen zu können. Diese werden im folgenden diskutiert.

### **5.2.1 Vergleich der Histonmethylierungen von A- und B-Chromosomen**

Chromatin kann in transkriptionsaktives Euchromatin und transkriptionsinaktives Heterochromatin unterteilt werden (Rice und Allis, 2001).

Da die Methylierung der Histone H3 und H4 eine Rolle in der Eu- und Heterochromatinformatierung spielen (Richards und Elgin, 2002), könnten Unterschiede der Modifikationen dieser Histone in den einzelnen Chromosomentypen Aufschluss über deren transkriptionellen Status geben. Methylierungen an Histon H3 Lysin 4 gelten als Euchromatin-spezifische Markierungen, während die Methylierung von Lysin 9 und Lysin 27 beim Histon H3 sowie Lysin 20 beim Histon H4 für heterochromatische Chromatinbereiche spezifisch ist (Lachner und Jenuwein, 2002; Fischle et al., 2003).

Die Giemsa-Bandierung an *B. dichromosomatica*-Chromosomen hat gezeigt, dass Standard-B-Chromosomen und A-Chromosomen einen ähnlichen Gehalt an Heterochromatin haben, während Mikro-B-Chromosomen stark heterochromatisch sind (Houben et al., 1997a). Die Immunofluoreszenz mit spezifischen Antikörpern demonstrierte, dass das Chromatin der A- und Standard-B-Chromosomen Unterschiede im Methylierungsstatus der Histone zeigte. Differenzen gab es auch zwischen den beiden B-Chromosomentypen, bedingt durch ihre unterschiedliche DNA-Zusammensetzung und eventuell durch unterschiedliche Transkriptionsaktivität beider B-Chromosomen. In *B. dichromosomatica* zeigte die Euchromatin-typische Methylierung von H3K4 Unterschiede zwischen den A- und B-Chromosomen. Während diese Markierung an den transkriptionsaktiven A-Chromosomen mit hoher Intensität über das gesamte Chromosom mit Ausnahme des Perizentromers, welches sich durch die Anreicherung von Heterochromatin auszeichnet (Karpen und Allshire, 1997), und einer weiteren heterochromatischen Region auftrat, waren die Standard-B-Chromosomen deutlich schwächer gekennzeichnet. Die Mikro-B-Chromosomen zeigten nur eine sehr schwache H3K4me1-Markierung und waren frei von Signalen für H3K4me2,3. Die Methylierung von Histon H3 an Lysin 4 gilt als hoch konserviert. So wurde im Einzeller *Tetrahymena* für den transkriptionsaktiven Makronukleus eine Korrelation zwischen H3K4-Methylierung und Transkriptionsaktivität festgestellt (Strahl et al., 1999). Untersuchungen an der Spaltheife ergaben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der H3K4-Methylierung und transkriptionsaktiven euchromatischen Regionen des Genoms (Noma et al., 2001). In *Saccharomyces cerevisiae* ist die Trimethylierung von H3K4 ausschließlich in aktiven euchromatischen Genen zu finden, während die Dimethylierung an dieser Position sowohl in aktiven als auch in inaktiven euchromatischen Genen detektiert wurde (Santos-Rosa et al., 2002). Analysen von Wirbeltieren zeigen, dass die Di- und Trimethylierungen von H3K4 mit einer Transkriptionsaktivität assoziieren (Schneider et al., 2004; Miao und Natarajan, 2005). In *Drosophila* kennzeichnen alle Methylierungsstadien von H3K4 aktives Chromatin (Ebert et al., 2006). In den Pflanzenspezies *A. thaliana*, *H. vulgare* und *V. faba* gelten H3K4-Methylierungen ebenfalls als typische Markierung für Euchromatin (Alvarez-Venegas und Avramova, 2005; Fuchs et al., 2006). Die einheitliche Verteilung der Heterochromatin-typischen Mono- und

Dimethylierung von H3K9 auf den A- und Standard-B-Chromosomen korreliert mit den Ergebnissen über Pflanzen mit großen Genomen. Houben et al. (2003) untersuchten 24 Pflanzenspezies mit unterschiedlicher Genomgröße und postulierten, dass bei Pflanzen mit einer Genomgröße unter 500 Mbp die Dimethylierung von H3K9 sich auf die heterochromatischen Chromozenter beschränkt. Bei einer Genomgröße von mehr als 500 Mbp verteilt sich die H3K9-Dimethylierung dispers über alle Chromosomen auf Grund der hohen Anzahl repetitiver Sequenzen. Da *B. dichromosomatica* eine Genomgröße von 1510 Mbp besitzt (Houben et al., 2003), bestätigt das beobachtete H3K9-Methylierungsmuster diese Annahme. Mono-, Di- und Trimethylierungen von H3K9 sind spezifische Histonmethylierungen für Heterochromatin von *D. melanogaster* (Ebert et al., 2004). Trimethyliertes H3K9 zeigte auf den A-Chromosomen eine disperse Verteilung mit Ausnahme des heterochromatischen Perizentromers. Dagegen waren die Standard-B-Chromosomen deutlich schwächer gekennzeichnet, und die Mikro-B-Chromosomen hatten eine kaum noch wahrnehmbare Markierung. Trimethylierungen von H3K9 sind typische euchromatische Marker in *A. thaliana* (Soppe et al., 2002; Jasencakova et al., 2003; Naumann et al., 2005), aber auch in *H. vulgare* markieren diese die genreichen Regionen (Euchromatin) der Metaphasechromosomen (Fuchs et al., 2006). Dagegen ist die Trimethylierung von H3K9 in Säugergenomen ein typisches Kennzeichen für Heterochromatin (Peters et al., 2003) und ist in *Neurospora* assoziiert mit inaktivierten Genregionen (Tamaru et al., 2003).

Die Monomethylierung von H3K27 ist auf den A- und beiden B-Chromosomen dispers mit vergleichbarer Intensität verteilt. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Pflanzenspezies *A. thaliana*, *H. vulgare* und *V. faba* ermittelt und kennzeichnen dort heterochromatische Bereiche (Fuchs et al., 2006). Während die Di- und Trimethylierungen an H3K27 der A- und Standard-B-Chromosomen Markierungen mit gleicher Intensität aufwiesen, die dispers mit Ausnahme des Perizentromers über das Chromosom verteilt waren, zeigten die Mikro-B-Chromosomen bei der Dimethylierung an dieser Position eine nur sehr schwache Markierung und bei der Trimethylierung keine Markierung. Das Auffinden von H3K27me3 auf den Standard-B-Chromosomen lässt die Vermutung zu, dass ein gewisser Anteil des Standard-B-Chromatins transkriptionsaktiv sein könnte. In *A. thaliana* sind H3K27me3 und in *H. vulgare* H3K27me2,3 Merkmale für euchromatische Bereiche (Fuchs et al., 2006). Im Gegensatz dazu markiert H3K27me2 in *A. thaliana* und

*V. faba* das Heterochromatin. In *D. melanogaster* ist das perizentrische Heterochromatin durch H3K27me<sub>1,2,3</sub> gekennzeichnet (Schotta et al., 2002; Ebert et al., 2004; Schotta et al., 2004). Im menschlichen Genom wird methyliertes H3K27 mit der Genunterdrückung und X-Chromosominaktivierung assoziiert (Miao und Natarajan, 2005).

Die Methylierungen an H4K20 unterschieden sich nicht zwischen A- und B-Chromosomen und waren dispers über die gesamten Chromosomen verteilt.

Bei *A. thaliana* gelten H4K20me<sub>2,3</sub> als typische euchromatische Marker, während H4K20me<sub>1</sub> sowohl in *A. thaliana* als auch in *H. vulgare* als heterochromatischer Marker auftritt (Naumann et al., 2005; Fuchs et al., 2006). Methylierungen an Histon H4K20 im menschlichen Genom stehen mit der Unterdrückung von Genen in Verbindung (Miao und Natarajan, 2005) sowie in *D. melanogaster* als Kennzeichen für Heterochromatin (Ebert et al., 2006).

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass sowohl A- als auch B-Chromosomen Lysinmethylierungen an Histon 3 und 4 unterworfen sind. Dabei scheint die Markierung heterochromatischer Bereiche in beiden Chromosomentypen ähnlich zu sein, während die Euchromatin-typischen Markierungen in den B-Chromosomen reduziert oder ganz verloren zu sein scheinen. Ähnliche Beobachtungen gibt es für inaktive X-Chromosomen in Säugern, in denen ebenfalls ein Verlust der Euchromatin-assoziierten Histonmethylierung H3K4 nachgewiesen wurde. Zusätzlich existiert jedoch eine Anreicherung von Methylierungen an H3K9 und H3K27, die mit Heterochromatin und Geninaktivierung korrelieren (Cohen und Lee, 2002; Silva et al., 2003; Heard, 2005). Eine vergleichbare Situation wie auf den inaktiven X-Chromosomen wurde auf den mit Heterochromatin angereicherten Y-Chromosomen in *Rumex acetosa* vorgefunden. Hier wurde im kondensierten Interphase-Sexchromatin eine Anreicherung von methylierten H3K9 und ein großer Verlust an methylierten H3K4 festgestellt (Mosiolek et al., 2005).

Houben et al. (1997a) zeigen eine Unteracetylierung der Standard-B-Chromosomen an Lysin 5 und Lysin 8 im Histon H4 auf. Diese Unteracetylierung im Histon H4 und die Untermethylierung im Histon H3 könnten möglicherweise eine gemeinsame Rolle in der Bildung des B-Chromosomen-Chromatins und der Transkriptionsinaktivierung der B-Chromosomen spielen.

### 5.2.2 Verhalten und Assoziation der Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus im Interphasekern

Der direkte Nachweis der Transkriptionsaktivität der B-Chromosomen-lokaliserten 45S rDNA mittels RT-PCR war auf Grund fehlender konstanter Sequenzunterschiede zwischen den ITS2-Sequenzen der A- und B-Chromosomen nicht möglich. Deshalb war das Ziel der Untersuchungen, die Positionen der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern relativ zum Nukleolus zu ermitteln, um indirekt den Transkriptionsstatus der 45S rDNA dieser Chromosomen zu bestimmen.

Eine diploide Zelle in *B. dichromosomatica* enthält zwei A-Chromosomen-lokalisierte NORs. Deshalb wären bei Aktivität der Mikro-B-Chromosomen-rDNA neben dem Auftreten zweier Nukleoli der A-Chromosomen eventuell zusätzliche Nukleoli der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern zu erwarten gewesen. Jedoch waren in der Mehrzahl Kerne mit nur einem Nukleolus, seltener mit zwei und in geringer Zahl mit mehr als zwei Nukleoli beobachtet worden. In der Literatur werden zwei Erklärungen für den Unterschied zwischen der Anzahl der NORs in Metaphasechromosomen und der Anzahl der Nukleoli im Interphasekern diskutiert: Entweder sind nicht alle NORs aktiv oder mehr als eine NOR ist an der Bildung eines Nukleolus beteiligt (Anastassova-Kristeva, 1977; Wachtler et al., 1986; Schwarzacher und Wachtler, 1993). Somit kann das Auftreten von nur einem Nukleolus in *B. dichromosomatica* entweder mit der Fusion aller NORs oder mit der Inaktivität von einigen NORs erklärt werden. Im Fall des Vorhandenseins von zwei Nukleoli ist es möglich, dass die zwei A-Chromosomen-NORs des diploiden Kerns jeweils einen Nukleolus und die Mikro-B-Chromosomen keine NORs bilden. Mikro-B-Chromosomen bilden anscheinend nur selten Nukleoli, was den geringen Prozentsatz von 1% bei drei oder mehr Nukleoli erklärt.

Differenzen gab es bei der Anzahl der markierten 45S rDNA-Signale der A-Chromosomen (A-Signale). Es wurden bis zu vier A-Signale detektiert, jedoch wurden am häufigsten zwei A-Signale vorgefunden. Dabei gab es signifikante Unterschiede zwischen den 2C- und 4C-Kernen hinsichtlich des Vorkommens von mehr als zwei Signalen. Dieses war in den 4C-Kernen häufiger als in den 2C-Kernen, was mit der Replikation der Chromosomen in der S-Phase des Zellzyklus erklärt werden könnte. Eine weitere Ursache für die unterschiedliche Anzahl von A-Signalen könnte in der repetitiven Natur der rDNA-Einheiten liegen. In den meisten Eukaryoten sind mehr rRNA-Gene vorhanden, als zur Erhaltung der Substanz an



Ribosomen benötigt wird. Aus diesem Grund ist nur ein kleiner Teil der rDNA-Einheiten transkriptionsaktiv, der Rest bleibt inaktiv (Carmo-Fonseca et al., 2000). In vielen Arten scheint diese Inaktivierung mit einem hohen Niveau an rDNA-Chromatinkondensation einherzugehen (Neves et al., 2005). Dadurch entsteht eine Organisation wechselnder Abschnitte kondensierter transkriptionsinaktiver und dekondensierter transkriptionsaktiver 45S rDNA-Abschnitte (Carmo-Fonseca et al., 2000). Dies könnte das Auftreten von drei bis vier 45S rDNA-Signalen in den 2C-Kernen begründen. Für die 4C-Kerne wäre eine weitere Erklärung für das Auffinden von mehr als zwei Hybridisierungssignalen eine Separation der Schwesterchromatiden, wie sie Schubert et al. (2006) in replizierten Kernen von *A. thaliana* fanden. In Roggen und Weizen zeigte die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit 45S rDNA in der Interphase, dass die kondensierte rDNA als Chromatinblock am Rand des Nukleolus zu sehen ist (Leitch et al., 1992; Delgado et al., 1995; Morais-Cecilio et al., 2000). Unterschiede gibt es bei der intranuklearen rDNA. Während in Roggen die rDNA in den meisten Fällen dekondensiert im Nukleolus auftritt, wechseln im Weizen kondensierte und dekondensierte rDNA-Abschnitte im Nukleolus (Leitch et al., 1992). Diese Eigenschaft scheint artspezifisch zu sein (Neves et al., 2005). Ähnliche Ergebnisse konnten in *B. dichromosomatica* beobachtet werden. Kondensierte rDNA verbleibt am Rand des Nukleolus. Im Innern des Nukleolus jedoch wurden weder dekondensierte noch kondensierte Abschnitte entdeckt. Möglicherweise tritt in *B. dichromosomatica* keine intranukleolare kondensierte rDNA auf. Wahrscheinlich ist, dass dekondensierte Abschnitte auf Grund der geringeren rDNA-Kopiendichte mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung nicht detektierbar sind und es somit zu einer scheinbaren Unterbrechung der rDNA-Signale kommt.

Eine Erklärung für das Auftreten von nur einem A-Signal in 2C- und 4C-Kernen könnte die räumliche Nähe der 45S rDNA-Regionen beider homologen A-Chromosomen sein.

Es ist allgemein akzeptiert, dass inaktive NORs nicht mit dem Nukleolus assoziieren und somit keine Verbindung mit der Transkriptionsmaschinerie und der ribosomalen Synthese haben (Wachtler et al., 1986; Schwarzacher und Wachtler, 1993; Sullivan et al., 2001). In Weizen z. B. wurden rDNA-Hybridisierungsorte außerhalb des Nukleolus detektiert, die mit stark kondensiertem Chromatin assoziiert waren (Leitch et al., 1992). In *B. dichromosomatica* zeigten 30% der Mikro-B-Chromosomen eine

Assoziation mit dem Nukleolus, während 70% nicht assoziierten. Die statistische Auswertung mit Hilfe eines Simulationsmodells ergab, dass die Assoziation bzw. Nichtassoziation der Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus nicht zufällig auftritt. Das deutet auf eine Transkriptionsinaktivität des größten Teils der Mikro-B-lokalisierten 45SrDNA.

Jedoch bedeutet die 30%-ige Assoziation der Mikro-B-Chromosomen nicht zwingend eine Transkriptionsaktivität Mikro-B-lokalisierter 45S rDNA.

In Maus-Mensch-Hybridzellen wurde demonstriert, dass auch die inaktiven NORs innerhalb des Nukleolus lokalisiert sein können (Sullivan et al., 2001). Die Autoren vermuten, dass neben der räumlichen Assoziation weitere noch unbekannte Faktoren, die den Transkriptionsstatus bestimmen, die rDNA-Transkription im Nukleolus regulieren könnten. Somit ist die Assoziation mit dem Nukleolus nicht immer ein sicheres Zeichen für aktive rDNA. Es wäre auch denkbar, dass sich der Transkriptionsstatus B-Chromosomen-lokalisierter rDNA in verschiedenen Gewebetypen unterscheidet. Donald et al. (1995) fand bei lichtmikroskopischen Untersuchungen Assoziationen zwischen Standard-B-Chromosomen und Nukleoli in mitotischen und meiotischen Zellen von Antheren. Jedoch ergaben spätere Analysen der Transkriptionsaktivität von Standard-B-Chromosomen-lokalisierter rDNA mittels RT-PCR in Blattgewebe eine Transkriptionsinaktivität dieser Gene (Donald et al., 1997).

Die oben aufgeführten Unterschiede in der Histonmethylierung zwischen den A- und B-Chromosomen sprechen als epigenetische Markierungen dafür, dass die B-lokalisierte 45S rDNA in Wurzelspitzenmeristemen transkriptionsinaktiv ist.

### **5.2.3 Positionen der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern**

Die zweidimensionale Analyse der Anordnung der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern offenbarte, dass diese zu 45% (2C) bzw. 38% (4C) in der Peripherie des Zellkerns zu finden waren. Es ist jedoch denkbar, dass die Anzahl der Mikro-B-Chromosomen an der Peripherie des Zellkerns bei einer dreidimensionalen Analyse noch höher ist. Bei dieser räumlichen Betrachtung könnte sich erweisen, dass ein Teil der Mikro-B-Chromosomen in der Position 1 ebenfalls am Rand des Zellkerns liegen. Somit ist vorstellbar, dass sich ein deutlich höherer Anteil der Mikro-B-Chromosomen am Zellkernrand befindet, als bei zufallsgemäßer Verteilung zu

erwarten wäre. Diese Ergebnisse zeigen Gemeinsamkeiten mit anderen Studien zur Korrelation der Chromosomenanordnung in der Interphase mit der Gendichte der Chromosomen und der Replikationszeit des Chromatins. So zeigen z. B. die Zellkerne des Huhns, dass die genreichen frühreplizierenden Mikrochromosomen im Zellkerninneren zu finden sind, während die genarmen spätreplizierenden Makrochromosomen in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert sind (Habermann et al., 2001; Tanabe et al., 2002). Ähnliche Verhältnisse wurden auch in Säugergenomen festgestellt (Sadoni et al., 1999; Cremer und Cremer, 2001; Scheuermann et al., 2004). Auch in Amphibien und Reptilien wurden räumliche Anordnungen dergestalt vorgefunden, dass gendichte Regionen das Innere des Zellkerns und genarme Regionen den äußeren Rand des Zellkerns belegen (Federico et al., 2006).

Vergleichende Studien über die funktionale Genomarchitektur in pflanzlichen (*A. cepa*, *P. sativum*) und tierischen (Chinesischer Hamster, *D. melanogaster*) Zellkernen ergaben eine Verteilung des frühreplizierenden Euchromatins im Zellkerninneren und des spätreplizierenden Heterochromatins in der Peripherie des Zellkerns (Mayr et al., 2003). Eine Ausnahme bildete *P. sativum*, wo das spätreplizierende Chromatin dispers über den gesamten Kern verteilt war. Die Autoren vermuteten, dass die räumliche Aufteilung in funktionell unterschiedlichen Chromosomenfraktionen nicht grundsätzlich in Pflanzen und Tieren erhalten sein muss. Dennoch deutet die ähnliche räumliche Aufteilung von tierischen und pflanzlichen Zellkernen auf eine evolutionäre Konservierung dieser nuklearen Eigenschaften hin (Tanabe et al., 2002; Mayr et al., 2003). Das könnte somit auch für die Zellkerne von *B. dichromosomatica* zutreffen. Im Gegensatz zu den Standard-B-Chromosomen, die spät in der S-Phase replizieren (Houben et al., 1997a), replizieren die Mikro-B-Chromosomen während der gesamten S-Phase (Marschner et al., 2007). Ein ähnliches Replikationsverhalten wurde für heterochromatische Regionen in Chromosomen von *A. fistulosum* beobachtet (Fujishige und Taniguchi, 1998).

Dieses Replikationsverhalten und das Auftreten eines Großteils der Mikro-B-Chromosomen an der Peripherie des Zellkerns unterstützt die Annahme, dass B-Chromosomen hauptsächlich nichtkodierende Sequenzen tragen und daher transkriptionsinaktiv sind.

Insgesamt weisen Resultate, wie die Histon-H4-Unterazetylierung (Houben et al., 1997a), die Histon-H3-Untermethylierung an bestimmten Lysinpositionen und die

späte Replikation oder eine Replikation während der gesamten S-Phase der DNA darauf hin, dass die B-Chromosomen von *B. dichromosomatica* einen inaktiven Transkriptionsstatus besitzen.

Berücksichtigt man das Hybridisierungsmodell bei der Entstehung der B-Chromosomen, könnte auch die nukleolare Dominanz für die Inaktivität der B-Chromosomen-lokalisierten rDNA verantwortlich sein. Die nukleolare Dominanz ist ein Phänomen in interspezifischen Hybriden, bei denen aktive NORs von nur einem elterlichen Genom gebildet werden, während die NORs der anderen elterlichen Art inaktiviert sind (Pikaard, 2002). Sie ist weitverbreitet in der Natur und tritt in Pflanzen und Tieren auf (Pikaard, 2000). Die Ursache des unterschiedlichen Transkriptionsstatus der A- und B-Chromosomen-lokalisierten rDNA von *B. dichromosomatica* könnte also in der nukleolaren Dominanz in der Form begründet sein, dass die rDNA der A-Chromosomen aktiv und die der B-Chromosomen unterdrückt ist (Donald et al., 1997). Ein weiterer Hinweis auf die Inaktivität der rDNA auf den B-Chromosomen ist die unvollständige Homogenisierung der A- und B-Chromosomen-lokalisierten rDNA, da der Mechanismus der Sequenzangleichung nur bei aktiven rDNA-Sequenzen erfolgt (Lim et al., 2000).

## 6 Zusammenfassung

Die *Asteraceae* *Brachycome dichromosomatica* (Synonym *Brachyscome dichromosomatica*) ist eine besonders geeignete Spezies, um B-Chromosomen zu analysieren. Die auf den B-Chromosomen-lokalisierte 45S rDNA wurde auf Ursprung und Funktion untersucht. Die Mikrodissektion von B-Chromosomen und die PCR mit spezifischen Primerpaaren ermöglichte es, B-Chromosomen-spezifische ITS2-Sequenzen der 45S rDNA zu erhalten. Diese wurden mit den ITS2-Sequenzen der A-Chromosomen verglichen. Auffallend bei dieser Analyse waren zwei beständige Single-Nucleotid-Polymorphismen zwischen den Sequenzen von A- und B-Chromosomen. Die Analyse der ITS2-Sequenzen der A- und B-Chromosomen und der Vergleich mit den ITS2-Sequenzen verwandter *Brachycome*-Arten deuten darauf hin, dass die B-Chromosomen-rRNA-Gene von den A-Chromosomen derselben Art abstammen. Phylogenetische Untersuchungen identifizierten keine Spezies, die eine ITS2-Sequenz hatte, die ähnlicher zu der B-Chromosomen-ITS2-Sequenz war als die A-Chromosomen-ITS2-Sequenz von *B. dichromosomatica*. Es wurde ein Ursprung der B-Chromosomen in der Zeit vor der Ausbildung der vier Cytodeme von *B. dichromosomatica* postuliert.

Da es nicht möglich war, die ITS2-Transkripte der A- und B-Chromosomen mit Hilfe der RT-PCR eindeutig voneinander zu unterscheiden, wurde die Transkriptionsaktivität der B-lokalisierten 45S rDNA indirekt untersucht. Dazu wurde die Kombination aus Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und Silberfärbung an sortierten 2C- und 4C-Interphasekernen genutzt, um die Position der Mikro-B-Chromosomen während der Interphase in Beziehung zur Position zum Nukleolus zu bestimmen. Mikro-B-Chromosomen bilden anscheinend nur selten Nukleoli, was den geringen Prozentsatz von drei oder mehr Nukleoli erklärt. Die Analyse der Assoziationen von Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus ergab, dass 30% von allen Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus assoziierten, während 70% nicht assoziiert waren. Um eine Aussage treffen zu können, ob die ermittelten Assoziationen von biologischer Signifikanz sind, wurden diese mit der zufallsbedingten Zahl von Assoziationen mit Hilfe eines Simulationsmodells verglichen. Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse ergab eine hohe Signifikanz des Unterschiedes zwischen zufälligen und beobachteten Assoziationen der Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus. Die hohe Frequenz von

nichtassoziierten Mikro-B-Chromosomen mit dem Nukleolus weist auf eine Inaktivität der Mikro-B-Chromosomen-lokalisierten 45S rDNA hin. Die Analysen zur Anordnung der Mikro-B-Chromosomen im Interphasekern offenbarten, dass sich ein deutlich höherer Anteil von Mikro-B-Chromosomen am Zellkernrand befindet, als bei zufallsgemäßer Verteilung zu erwarten wäre. Die Ergebnisse zeigen Gemeinsamkeiten mit anderen Studien zur Korrelation der Chromosomenanordnung in der Interphase mit der Gendichte der Chromosomen und der Replikationszeit des Chromatins. Das Replikationsverhalten und das hauptsächliche Auftreten der Mikro-B-Chromosomen in der Peripherie des Zellkerns unterstützen die Annahme, dass diese B-Chromosomen vorwiegend nichtkodierende Sequenzen tragen und daher transkriptionsinaktiv sind.

Wenig bekannt ist bisher über die Chromatinzusammensetzung der B-Chromosomen und ob diese sich von derjenigen der A-Chromosomen unterscheidet. Um zu prüfen, ob die A- und B-Chromosomen in ihrem Gehalt an Euchromatin- und Heterochromatin-spezifischen Histonmarkierungen variieren, wurden die A-Chromosomen und die zwei unterschiedlichen B-Chromosomen-Typen von *B. dichromosomatica* mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung vergleichend analysiert. Die Beobachtungen zeigten, dass das Eu- und Heterochromatin der B-Chromosomen wie bei den A-Chromosomen Histon-H3-Methylierungen an Lysin 4, 9 und 27 sowie Histon-H4-Methylierungen an Lysin 20 unterzogen werden. Dabei wiesen die Standard-B-Chromosomen einen reduzierten Grad der euchromatischen Histonmarkierungen H3K4me1,2,3 und H3K9me3 auf, während die heteropygnotischen Mikro-B-Chromosomen nur Spuren dieser Histonmodifikationen zeigten. Keine Unterschiede zwischen den A- und B-Chromosomen wurden für die heterochromatischen Markierungen H3K9me1,2 und H3K27me1 gefunden. Die Methylierungen an H4K20 unterschieden sich nicht zwischen A- und B-Chromosomen und waren dispers über die gesamten Chromosomen verteilt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die inaktiven B-Chromosomen nicht spezifisch durch heterochromatische Histonmarkierungen gekennzeichnet sind, aber spezifisch durch einen reduzierten Grad an euchromatischen Histonmodifikationen markiert sind.



	142		175
	*		*
A2-A1 :	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C A T		
A2-A2 :	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C A T		
A2-A3 :	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C A T		
A2-A4 :	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C A T		
A2-nB1:	A G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T A A A A A A G G T G C A T		
A2-nB2:	A G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C A T		
A2-nB3:	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C A T		
A2-nB4:	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C T T		
A2-nB5:	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C T T		
A2-mB1:	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C T T		
A2-mB2:	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A T G T G C T T		
A2-mB3:	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A T A A G G T G C A T		
A2-mB4:	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T A C A A A A A G G T G C A T		
A1-A1 :	G G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C T T		
A1-nB1:	A G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T C A A A A A G G T G C A T		
Blin1 :	A G A A T C G T G T C G T G T G T C T T T T A T A A A A G G T G C A T		
A2-A1 :	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
A2-A2 :	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
A2-A3 :	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
A2-A4 :	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T C G A C A A C G C		
A2-nB1:	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
A2-nB2:	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
A2-nB3:	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
A2-nB4:	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A T A A C G C		
A2-nB5:	C T T A A G A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
A2-mB1:	C T T A A T A G A C T C A		
A2-mB2:	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A C T T G A C A A C G C		
A2-mB3:	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
A2-mB4:	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T C T G A C A A C G C		
A1-A1 :	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
A1-nB1:	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C A T T T G A C A A C G C		
Blin1 :	C T T A A T A G A C C C A A C G T G T T G T C G T T T G A C A A C G C		
A2-A1 :	T T C G A C C		
A2-A2 :	T T C G A C C		
A2-A3 :	T T C G A C C		
A2-A4 :	T T C G A C C		
A2-nB1:	T T C G A C C		
A2-nB2:	T T C G A C C		
A2-nB3:	T T C G A C C		
A2-nB4:	T T C G A C C		
A2-nB5:	T T C G A C C		
A2-mB1:			
A2-mB2:	T T C G A C C		
A2-mB3:	T T C G A C C		
A2-mB4:	T T C G A C C		
A1-A1 :	T T C G A C C		
A1-nB1:	T T C G A C C		
Blin1 :	T T C G A C C		

**Abb. 28:** Vergleich der ITS2-Sequenzen von A-Chromosomen (A2-A1-4), Standard-B-Chromosomen (A2-nB1-5) und Mikro-B-Chromosomen (A2-mB1-4) von *B. dichromosomatica* Cytothem A2 und ITS2-Sequenzen von A-Chromosomen (A1-A1) und Standard-B-Chromosomen (A1-nB1) von *B. dichromosomatica* Cytothem A1 und von *B. lineariloba*, Zytotyp C (Blin1) (Donald et al., 1997). Die oben angegebenen Sequenzlängen beziehen sich auf die in der Publikation von Donald et al. (1997) veröffentlichten Sequenzen.



## 8 Literaturverzeichnis

- Alfenito, M.R., und Birchler, J.A.** (1993). Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics* **135**, 589-597.
- Alvarez-Venegas, R., und Avramova, Z.** (2005). Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive *Arabidopsis* genes and in *atx1* mutants. *Nucleic Acids Res* **33**, 5199-5207.
- Anastassova-Kristeva, M.** (1977). The nucleolar cycle in man. *J Cell Sci* **25**, 103-110.
- Appels, R., und Honeycutt, R.L.** (1986). rDNA: Evolution over a billion years. In Dutta S.K.(Ed.) *DNA Systematics, Vol II: Plants*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 81-135.
- Baldwin, B.G.** (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the *compositae*. *Mol Phylogenet Evol* **1**, 3-16.
- Beukeboom, L.W.** (1994). Bewildering Bs - an Impression of the 1st B-Chromosome Conference. *Heredity* **73**, 328-336.
- Bloom, S.E., und Goodpasture, C.** (1976). An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum Genet* **34**, 199-206.
- Blunden, R., Wilkes, T.J., Forster, J.W., Jimenez, M.M., Sandery, M.J., A., K., und Jones, N.** (1993). Identification of the E3900 family, a second family of rye B chromosomes specific repeated sequences. *Genome* **33**, 706-711.
- Bougourd, S.M., und Parker, J.S.** (1979). B-Chromosome System of *Allium-Schoenoprasum* .2. Stability, Inheritance and Phenotypic Effects. *Chromosoma* **75**, 369-383.
- Bridger, J.M., und Bickmore, W.A.** (1998). Putting the genome on the map. *Trends Genet* **14**, 403-409.
- Buckler, E.S.t., Phelps-Durr, T.L., Buckler, C.S., Dawe, R.K., Doebley, J.F., und Holtsford, T.P.** (1999). Meiotic drive of chromosomal knobs reshaped the maize genome. *Genetics* **153**, 415-426.
- Camacho, J.P., Sharbel, T.F., und Beukeboom, L.W.** (2000). B-chromosome evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 163-178.
- Campbell, C.S., Wojciechowski, M.F., Baldwin, B.G., Alice, L.A., und Donoghue, M.J.** (1997). Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the Amelanchier agamic complex (*Rosaceae*). *Mol Biol Evol* **14**, 81-90.
- Carlson, W.R.** (1988). B Chromosomes as a Model System for Nondisjunction. *Aneuploidy, Part B: Induction and Test Systems*, Alan R. Liss, Inc., 199-207.
- Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., und Campos, I.** (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* **2**, E107-112.
- Carter, C.R.** (1978a). Cytology of *Brachycome* .8. Inheritance, Frequency and Distribution of B Chromosomes in *Brachyome dichromosomatica* (N=2), Formerly Included in *Brachycome lineariloba*. *Chromosoma* **67**, 109-121.

- Carter, C.R.** (1978b). Cytology of *Brachycome* .2. Subgenus *Metabrachycome* - General Survey. Australian Journal of Botany **26**, 699-706.
- Carter, C.R.** (1978c). Taxonomy of the *Brachycome lineariloba* complex ( Asteraceae). Telopea **1(5)**, 387-393.
- Carter, C.R., und Smith-White, S.** (1972). Cytology of *Brachycome lineariloba* .3. Accessory Chromosomes. Chromosoma **39**, 361-&.
- Charlesworth, B., und Charlesworth, D.** (2000). The degeneration of Y chromosomes. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **355**, 1563-1572.
- Charlesworth, D.** (2002). Plant sex determination and sex chromosomes. Heredity **88**, 94-101.
- Cheng, Y.M., und Lin, B.Y.** (2003). Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. Genetics **164**, 299-310.
- Cockell, M., und Gasser, S.M.** (1999). Nuclear compartments and gene regulation. Curr Opin Genet Dev **9**, 199-205.
- Cohen, D.E., und Lee, J.T.** (2002). X-chromosome inactivation and the search for chromosome-wide silencers. Curr Opin Genet Dev **12**, 219-224.
- Cremer, T., und Cremer, C.** (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. Nat Rev Genet **2**, 292-301.
- Davis, G.L.** (1948). A revision of the genus *Brachycome*. Proc. Linn. Soc. New South Wales **73**, 142-241.
- Delgado, M., Morais-Cecilio, L., Neves, N., Jones, R.N., und Viegas, W.** (1995). The influence of B chromosomes on rDNA organization in rye interphase nuclei. Chromosome Res **3**, 487-491.
- Dhar, M.K., Friebe, B., Koul, A.K., und Gill, B.S.** (2002). Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. Chromosoma **111**, 332-340.
- Dolezel, J., Cihalikova, J., und Lucretti, S.** (1992). A High-Yield Procedure for Isolation of Metaphase Chromosomes from Root-Tips of *Vicia-Faba* L. Planta **188**, 93-98.
- Donald, T.M., Leach, C.R., Clough, A., und Timmis, J.N.** (1995). Ribosomal RNA genes and the B chromosome of *Brachycome dichromosomatica*. Heredity **74 ( Pt 5)**, 556-561.
- Donald, T.M., Houben, A., Leach, C.R., und Timmis, J.N.** (1997). Ribosomal RNA genes specific to the B chromosomes in *Brachycome dichromosomatica* are not transcribed in leaf tissue. Genome **40**, 674-681.
- Dover, G.** (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature **299**, 111-117.
- Ebert, A., Lein, S., Schotta, G., und Reuter, G.** (2006). Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. Chromosome Res **14**, 377-392.
- Ebert, A., Schotta, G., Lein, S., Kubicek, S., Krauss, V., Jenuwein, T., und Reuter, G.** (2004). Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. Genes Dev **18**, 2973-2983.
- Elder, J.F., Jr., und Turner, B.J.** (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. Q Rev Biol **70**, 297-320.

- Federico, C., Scavo, C., Cantarella, C.D., Motta, S., Saccone, S., und Bernardi, G.** (2006). Gene-rich and gene-poor chromosomal regions have different locations in the interphase nuclei of cold-blooded vertebrates. *Chromosoma* **115**, 123-128.
- Feldman, M., Liu, B., Segal, G., Abbo, S., Levy, A.A., und Vega, J.M.** (1997). Rapid elimination of low-copy DNA sequences in polyploid wheat: a possible mechanism for differentiation of homoeologous chromosomes. *Genetics* **147**, 1381-1387.
- Felsenfeld, G., und Groudine, M.** (2003). Controlling the double helix. *Nature* **421**, 448-453.
- Felsenstein, J.** (1974). The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* **78**, 737-756.
- Ferreira, J., Paoletta, G., Ramos, C., und Lamond, A.I.** (1997). Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. *J Cell Biol* **139**, 1597-1610.
- Field, B.L., Houben, A., J. N. Timmis, und C.R., L.** (2006). Internal transcribed spacer sequence analyses indicate cytoevolutionary patterns within *Brachycome* Cass. (*Asteraceae*). *Plant Systematics and Evolution* **259**, 39-51.
- Fischle, W., Wang, Y., und Allis, C.D.** (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature* **425**, 475-479.
- Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D.I., und Groudine, M.** (2000). Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 137-143.
- Franks, T.K., Houben, A., Leach, C.R., und Timmis, J.N.** (1996). The molecular organisation of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* **105**, 223-230.
- Fuchs, J., und Schubert, I.** (1995). Localization of seed protein genes on metaphase chromosomes of *Vicia faba* via fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Res* **3**, 94-100.
- Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A., und Schubert, I.** (2006). Chromosomal histone modification patterns - from conservation to diversity (vol 11, pg 199, 2006). *Trends in Plant Science* **11**, 212-212.
- Fujishige, I., und Taniguchi, K.** (1998). Sequence of DNA replication in *Allium fistulosum* chromosomes during S-phase. *Chromosome Res* **6**, 611-619.
- Gernand, D., Rutten, T., Varshney, A., Rubtsova, M., Prodanovic, S., Bruss, C., Kumlehn, J., Matzk, F., und Houben, A.** (2005). Uniparental chromosome elimination at mitosis and interphase in wheat and pearl millet crosses involves micronucleus formation, progressive heterochromatinization, and DNA fragmentation. *Plant Cell* **17**, 2431-2438.
- Graphodatsky, A.S., Kukekova, A.V., Yudkin, D.V., Trifonov, V.A., Vorobieva, N.V., Beklemisheva, V.R., Perelman, P.L., Graphodatskaya, D.A., Trut, L.N., Yang, F., Ferguson-Smith, M.A., Acland, G.M., und Aguirre, G.D.** (2005). The proto-oncogene C-KIT maps to canid B-chromosomes. *Chromosome Res* **13**, 113-122.
- Green, D.M.** (1990). Muller's Ratchet and the Evolution of supernumerary chromosomes. *Genome* **33**, 818-824.

- Greilhuber, J., und Speta, F.** (1976). C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persia*, and *Puschkina* (Liliaceae). Plant Systematics and Evolution **126**, 149-188.
- Gutknecht, J., Sperlich, D., und Bachmann, L.** (1995). A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. Chromosoma **103**, 539-544.
- Habermann, F.A., Cremer, M., Walter, J., Kreth, G., von Hase, J., Bauer, K., Wienberg, J., Cremer, C., Cremer, T., und Solovei, I.** (2001). Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells. Chromosome Res **9**, 569-584.
- Heard, E.** (2005). Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. Curr Opin Genet Dev **15**, 482-489.
- Henning, W.** (2002). Genetik. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 406-409.
- Hernandez-Verdun, D.** (2006). Nucleolus: from structure to dynamics. Histochem Cell Biol **125**, 127-137.
- Heslop-Harrison, J.S.** (2000). Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes. Plant Cell **12**, 617-636.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Porter, C.A., und Baker, R.J.** (1991). Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. Science **251**, 308-310.
- Hizume, M., Sato, S., und Tanaka, A.** (1980). A highly reproducible method of nucleolus organizing regions staining in plants. Stain Technol **55**, 87-90.
- Holmes, D.S., und Bougourd, S.M.** (1989). B-Chromosome Selection in *Allium-Schoenoprasum* .1. Natural-Populations. Heredity **63**, 83-87.
- Houben, A., Field, B.L., und Saunders, V.A.** (2001a). Microdissection and chromosome painting of plant B chromosomes. Methods Cell Sci **23**, 115-124.
- Houben, A., Belyaev, N.D., Leach, C.R., und Timmis, J.N.** (1997a). Differences of histone H4 acetylation and replication timing between A and B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. Chromosome Res **5**, 233-237.
- Houben, A., Verlin, D., Leach, C.R., und Timmis, J.N.** (2001b). The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. Chromosoma **110**, 451-459.
- Houben, A., Leach, C.R., Verlin, D., Rofe, R., und Timmis, J.N.** (1997b). A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. Chromosoma **106**, 513-519.
- Houben, A., Thompson, N., Ahne, R., Leach, C.R., Verlin, D., und Timmis, J.N.** (1999). A monophyletic origin of the B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica* (Asteraceae). Plant Systematics and Evolution **219**, 127-135.
- Houben, A., Wanner, G., Hanson, L., Verlin, D., Leach, C.R., und Timmis, J.N.** (2000). Cloning and characterisation of polymorphic heterochromatic segments of *Brachycome dichromosomatica*. Chromosoma **109**, 206-213.
- Houben, A., Demidov, D., Gernand, D., Meister, A., Leach, C.R., und Schubert, I.** (2003). Methylation of histone H3 in euchromatin of plant

- chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant J* **33**, 967-973.
- Hubbell, H.R.** (1985). Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol* **60**, 285-294.
- Jamilena, M., Ruiz Rejon, C., und Ruiz Rejon, M.** (1994). A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *J Cell Sci* **107** ( Pt 3), 703-708.
- Jasencakova, Z., Soppe, W.J., Meister, A., Gernand, D., Turner, B.M., und Schubert, I.** (2003). Histone modifications in *Arabidopsis*- high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant J* **33**, 471-480.
- Jenuwein, T., und Allis, C.D.** (2001). Translating the histone code. *Science* **293**, 1074-1080.
- John, U.P., Leach, C.R., und Timmis, J.N.** (1991). A sequence specific to B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Genome* **34**, 739-744.
- Jones, N., und Houben, A.** (2003). B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends Plant Sci* **8**, 417-423.
- Jones, R.N.** (1975). B-chromosome systems in flowering plants and animal species. *Int Rev Cytol* **40**, 1-100.
- Jones, R.N.** (1991). B-chromosome drive. *American Naturalist* **137**, 430-442.
- Jones, R.N.** (1995). Tansley review no 85 - B chromosomes in plants. *New Phytologist* **131**, 411-434.
- Jones, R.N.** (2004). B Chromosomes. *Encyclopedia of Plant und Crop Science*, Marcel Dekker, New York.
- Jones, R.N., und Rees, H.** (1982). B Chromosomes. Academic Press, London.
- Jones, R.N., und Puertas, M.J.** (1993). B-Chromosomes of rye. In: Dhir KK, Sareen TS, eds. *Frontiers in Plant Science Research*. Delhi (India): Bhagwati Enterprises, 81-112.
- Karpen, G.H., und Allshire, R.C.** (1997). The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet* **13**, 489-496.
- Kornberg, R.D.** (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871.
- Kubicek, S., und Jenuwein, T.** (2004). A crack in histone lysine methylation. *Cell* **119**, 903-906.
- Kyhos, D.W., Carter, C.R., und Smithwhite, S.** (1977). Cytology of *Brachycome-Lineariloba* .7. Meiosis in Natural Hybrids and Race Relationships. *Chromosoma* **65**, 81-101.
- Lachner, M., und Jenuwein, T.** (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 286-298.
- Leach, C.R., Houben, A., und Timmis, J.N.** (2004). The B chromosomes in *Brachycome*. *Cytogenet Genome Res* **106**, 199-209.
- Leach, C.R., Donald, T.M., Franks, T.K., Spiniello, S.S., Hanrahan, C.F., und Timmis, J.N.** (1995). Organisation and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma* **103**, 708-714.
- Leach, C.R., Houben, A., Field, B., Pistrick, K., Demidov, D., und Timmis, J.N.** (2005). Molecular evidence for transcription of genes on a B chromosome in *Crepis capillaris*. *Genetics*.

- Leitch, A.R., Mosgoller, W., Shi, M., und Heslop-Harrison, J.S.** (1992). Different patterns of rDNA organization at interphase in nuclei of wheat and rye. *J Cell Sci* **101** ( Pt 4), 751-757.
- Liao, D.** (1999). Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am J Hum Genet* **64**, 24-30.
- Lim, K.Y., Kovarik, A., Matyasek, R., Bezdek, M., Lichtenstein, C.P., und Leitch, A.R.** (2000). Gene conversion of ribosomal DNA in *Nicotiana tabacum* is associated with undermethylated, decondensed and probably active gene units. *Chromosoma* **109**, 161-172.
- Lim, K.Y., Skalicka, K., Koukalova, B., Volkov, R.A., Matyasek, R., Hemleben, V., Leitch, A.R., und Kovarik, A.** (2004). Dynamic changes in the distribution of a satellite homologous to intergenic 26-18S rDNA spacer in the evolution of *Nicotiana*. *Genetics* **166**, 1935-1946.
- Loidl, P.** (2004). A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci* **9**, 84-90.
- Lopez-Leon, M.D., Cabrero, J., und Camacho, J.P.** (1999). Unusually high amount of inactive ribosomal DNA in the grasshopper *Stauroderus scalaris*. *Chromosome Res* **7**, 83-88.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., und Richmond, T.J.** (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Maloisel, L., und Rossignol, J.L.** (1998). Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascobolus*. *Genes Dev* **12**, 1381-1389.
- Maluszynska, J., und Schweizer, D.** (1989). Ribosomal RNA genes in B chromosomes of *Crepis capillaris* detected by non-radioactive in situ hybridization. *Heredity* **62** ( Pt 1), 59-65.
- Marschner, S., Kumke, K., und Houben, A.** (2007). B chromosomes of *B. dichromosomatica* show a reduced level of euchromatic histone H3 methylation marks. *Chromosome Res* **15**, 215-222.
- Martin, C., und Zhang, Y.** (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 838-849.
- Mayr, C., Jasencakova, Z., Meister, A., Schubert, I., und Zink, D.** (2003). Comparative analysis of the functional genome architecture of animal and plant cell nuclei. *Chromosome Res* **11**, 471-484.
- McAllister, B.F., und Werren, J.H.** (1997). Hybrid origin of a B chromosome (PSR) in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Chromosoma* **106**, 243-253.
- McVean, G.T.** (1995). Fractious chromosomes: hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. *Bioessays* **17**, 579-582.
- Miao, F., und Natarajan, R.** (2005). Mapping global histone methylation patterns in the coding regions of human genes. *Mol Cell Biol* **25**, 4650-4661.
- Morais-Cecilio, L., Delgado, M., Jones, R.N., und Viegas, W.** (2000). Modification of wheat rDNA loci by rye B chromosomes: a chromatin organization model. *Chromosome Res* **8**, 341-351.
- Mosiolek, M., Pasierbek, P., Malarz, J., Mos, M., und Joachimiak, A.J.** (2005). *Rumex acetosa* Y chromosomes: constitutive or facultative heterochromatin? *Folia Histochem Cytobiol* **43**, 161-167.
- Moss, J.P.** (1966). The adaptive significance of B chromosomes in rye. *Chromosomes today* **1**, 15-23.

- Muller, H.J.** (1964). The Relation of Recombination to Mutational Advance. *Mutat Res* **106**, 2-9.
- Müntzig, A.** (1963). Effects of accessory chromosomes in diploid and tetraploid rye. *Hereditas* **49**, 371-426.
- Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss, V., Phalke, S., Irmeler, K., Hause, G., Aurich, A.C., Dorn, R., Jenuwein, T., und Reuter, G.** (2005). Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *Embo J* **24**, 1418-1429.
- Neves, N., Delgado, M., Silva, M., Caperta, A., Morais-Cecilio, L., und Viegas, W.** (2005). Ribosomal DNA heterochromatin in plants. *Cytogenet Genome Res* **109**, 104-111.
- Noma, K., Allis, C.D., und Grewal, S.I.** (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science* **293**, 1150-1155.
- Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Shen, E., Carroll, R.E., und Busch, H.** (1985). Nucleogenesis: composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma* **92**, 330-336.
- Page, B.T., Wanous, M.K., und Birchler, J.A.** (2001). Characterization of a maize chromosome 4 centromeric sequence: evidence for an evolutionary relationship with the B chromosome centromere. *Genetics* **159**, 291-302.
- Pecinka, A., Schubert, V., Meister, A., Kreth, G., Klatte, M., Lysak, M.A., Fuchs, J., und Schubert, I.** (2004). Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma* **113**, 258-269.
- Pederson, T., und Politz, J.C.** (2000). The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *J Cell Biol* **148**, 1091-1095.
- Perfectti, F., und Werren, J.H.** (2001). The interspecific origin of B chromosomes: experimental evidence. *Evolution Int J Org Evolution* **55**, 1069-1073.
- Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H., und Jenuwein, T.** (2003). Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* **12**, 1577-1589.
- Pikaard, C.S.** (2000). Nucleolar dominance: uniparental gene silencing on a multi-megabase scale in genetic hybrids. *Plant Molecular Biology* **43**, 163-177.
- Pikaard, C.S.** (2002). Transcription and tyranny in the nucleolus: the organisation, activation, dominance and repression of ribosomal genes, in Somerville CR, Meyerowitz EM (eds): *The Arabidopsis Book* (American Society of Plant Biologists), Rockville MD.
- Randolph, L.F.** (1941). Genetic Characteristics of the B-Chromosomes in Maize. *Genetics* **16**, 608 - 631.
- Rice, J.C., und Allis, C.D.** (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 263-273.
- Richards, E.J., und Elgin, S.C.** (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**, 489-500.

- Riddle, N.C., und Birchler, J.A.** (2003). Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends Genet* **19**, 597-600.
- Rigby, P.W., Dieckmann, M., Rhodes, C., und Berg, P.** (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* **113**, 237-251.
- Rogers, S.O., und Bendich, A.J.** (1987). Ribosomal-RNA Genes in Plants - Variability in Copy Number and in the Intergenic Spacer. *Plant Molecular Biology* **9**, 509-520.
- Sadoni, N., Langer, S., Fauth, C., Bernardi, G., Cremer, T., Turner, B.M., und Zink, D.** (1999). Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments. *J Cell Biol* **146**, 1211-1226.
- Salkin, E., Thomlinson, G., Armstrong, B., B., C., Peate, N., und Schaumann, M.** (1995). Australien *Brachycomes*. The Australien Daisy Group.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Labatory Press, Cold spring Harbor., New York.
- Sandery, M.J., Forster, J.W., Blunden, R., und Jones, N.** (1990). Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome* **33**, 908-913.
- Sang, T., Crawford, D.J., und Stuessy, T.F.** (1995). Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6813-6817.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., und Kouzarides, T.** (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**, 407-411.
- Sapre, A.B., und Deshpande, D.S.** (1987). Origin of B-Chromosomes in *Coix L* through Spontaneous Interspecific Hybridization. *Journal of Heredity* **78**, 191-196.
- Schartl, M., Nanda, I., Schlupp, I., Wilde, B., Epplen, J.T., Schmid, M., und Parzefall, J.** (1995). Incorporation of Subgenomic Amounts of DNA as Compensation for Mutational Load in a Gynogenetic Fish (Vol 373, Pg 68, 1995). *Nature* **374**, 196-196.
- Scheuermann, M.O., Tajbakhsh, J., Kurz, A., Saracoglu, K., Eils, R., und Lichter, P.** (2004). Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei. *Exp Cell Res* **301**, 266-279.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., und Kouzarides, T.** (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* **6**, 73-77.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., und Jenuwein, T.** (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**, 1251-1262.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R., und Reuter, G.** (2002). Central role of



- Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *Embo J* **21**, 1121-1131.
- Schubeler, D., Scalzo, D., Kooperberg, C., van Steensel, B., Delrow, J., und Groudine, M.** (2002). Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat Genet* **32**, 438-442.
- Schubert, V., Klatte, M., Pecinka, A., Meister, A., Jasencakova, Z., und Schubert, I.** (2006). Sister chromatids are often incompletely aligned in meristematic and endopolyploid interphase nuclei of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **172**, 467-475.
- Schwarzacher, H.G., und Wachtler, F.** (1993). The nucleolus. *Anat Embryol (Berl)* **188**, 515-536.
- Sharbel, T.F., Green, D.M., und Houben, A.** (1998). B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* **41**, 14-22.
- Shaw, P.J., Beven, A.F., Wells, B., Highett, I., und Jordan, E.G.** (1996). The organisation of nucleolar activity in plants. *Journal of Mikroskopy* **181**, 178-185.
- Silva, J., Mak, W., Zvetkova, I., Appanah, R., Nesterova, T.B., Webster, Z., Peters, A.H., Jenuwein, T., Otte, A.P., und Brockdorff, N.** (2003). Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell* **4**, 481-495.
- Smith-White, S., und Carter, C.R.** (1970). The cytology of *Brachycome lineariloba*. 2. The chromosome species and their relationships. *Chromosoma* **30**, 129-153.
- Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I., und Frasz, P.F.** (2002). DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *Embo J* **21**, 6549-6559.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Stark, E.A., Connerton, I., Bennett, S.T., Barnes, S.R., Parker, J.S., und Forster, J.W.** (1996). Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Res* **4**, 15-23.
- Stitou, S., Diaz de La Guardia, R., Jimenez, R., und Burgos, M.** (2000). Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (*Rodentia, Muridae*). Implications for their origin and evolution. *Chromosome Res* **8**, 305-311.
- Strahl, B.D., und Allis, C.D.** (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-45.
- Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G., und Allis, C.D.** (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14967-14972.
- Sullivan, G.J., Bridger, J.M., Cuthbert, A.P., Newbold, R.F., Bickmore, W.A., und McStay, B.** (2001). Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. *Embo J* **20**, 2867-2874.
- Swofford, D.** (2002. PAUP\*). Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Assoc., Sunderland.

- Szczerbal, I., Kaczmarek, M., und Switonski, M.** (2005). Compound mosaicism, caused by B chromosome variability, in the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides*). *Folia Biologica-Krakow* **53**, 155-159.
- Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P.B., Nakayama, J., Grewal, S.I., Allis, C.D., Cheng, X., und Selker, E.U.** (2003). Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat Genet* **34**, 75-79.
- Tanabe, H., Habermann, F.A., Solovei, I., Cremer, M., und Cremer, T.** (2002). Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res* **504**, 37-45.
- Tanic, N., Vujosevic, M., Dedovic-Tanic, N., und Dimitrijevic, B.** (2005). Differential gene expression in yellow-necked mice *Apodemus flavicollis* (*Rodentia, Mammalia*) with and without B chromosomes. *Chromosoma* **113**, 418-427.
- Timmis, J.N., Ingle, J., Sinclair, J., und Jones, N.** (1975). The genomic quality of rye B chromosomes. *J. Exp. Bot.* **26**, 367-378.
- van Holde, K.E.** (1988). *Chromatin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- van Vught, J.** (2005). The mode of action, origin and structure of the paternal sex ratio chromosome in the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. Ph.D. thesis, Wageningen University, The Netherlands, pp120.
- van Vught, J.J., de Nooijer, S., Stouthamer, R., und de Jong, H.** (2005). NOR activity and repeat sequences of the paternal sex ratio chromosome of the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. *Chromosoma* **114**, 410-419.
- Wachtler, F., Hopman, A.H., Wiegant, J., und Schwarzacher, H.G.** (1986). On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. Studies with a new, non-autoradiographic in situ hybridization method. *Exp Cell Res* **167**, 227-240.
- Walsh, J.B., und Stephan, W.** (2001). Multigene Families: Evolution. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-6.
- Watanabe, K., und Smith-White, S.** (1987). The Cytology of *Brachyscome lineariloba* (*Compositae, Asteroidae*). 10. Phyletic and Evolutionary Relationships of *Brachyscome lineariloba* (*Compositae*). *Plant Systematics and Evolution* **157**, 121-141.
- Watanabe, K., Carter, C.R., und Smithwhite, S.** (1975). Cytology of *Brachyscome lineariloba*. 5. Chromosome Relationships and Phylogeny of Race-a Cytodemes (N=2). *Chromosoma* **52**, 383-397.
- Watanabe, K., Carter, C.R., und Smithwhite, S.** (1985). The Cytology of *Brachyscome lineariloba*. 9. Chromosomal Heterogeneity in Natural-Populations of Cytodeme-C (2n = 16). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **27**, 410-420.
- Webb, G.C.** (1976). Chromosome organisation in the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera*. 1. Banding relationships of the normal and supernumerary chromosomes. *Chromosoma* **55**, 229-246.
- Williams, R.R.** (2003). Transcription and the territory: the ins and outs of gene positioning. *Trends Genet* **19**, 298-302.
- Zhang, Y., und Reinberg, D.** (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**, 2343-2360.

**Ziegler, C.G., Lamatsch, D.K., Steinlein, C., Engel, W., Scharl, M., und Schmid, M. (2003).** The giant B chromosome of the cyprinid fish *Alburnus alburnus* harbours a retrotransposon-derived repetitive DNA sequence. *Chromosome Res* **11**, 23-35.

## **Danksagung**

Diese Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe Chromosomenstruktur –und -funktion in der Abteilung Cytogenetik und Genomanalyse am Leibnitz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben.

Mein besonderer Dank gilt dem Arbeitsgruppenleiter Dr. Andreas Houben für die Überlassung des interessanten Themas und für die Chance, die er mir damit gegeben hat. Zudem möchte ich ihm für die Anregungen und Hilfestellungen danken, die für das Fortschreiten dieser Arbeit unentbehrlich waren und dafür, dass er sich stets Zeit nahm für Fragen und Probleme.

Prof. Dr. Frank Pohlheim danke ich für seine Bereitschaft der Betreuung von universitärer Seite.

Weiterhin möchte ich mich bei folgenden Mitarbeitern bedanken:

Margit Hantschmann und Katrin Kumke für ihre Unterstützung im Labor und ihre freundliche, aufbauende Art der Zusammenarbeit.

Dr. Dmitri Demidov und Dr. Dorota Gernand für ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und kollegiale Art.

Dr. Armin Meister für die große Unterstützung bei den statistischen Auswertungen und für die interessanten und aufschlussreichen Diskussionen.

Veit Schubert für das Durchsehen dieser Arbeit und die wertvollen Kommentare zu der vorliegenden Arbeit.

Dr. Jörg Fuchs für die Zusammenarbeit bei der Durchflusszytometrie.

Dr. Marion Röder für die Zusammenarbeit bei der Analyse mit dem ALFexpress.

Dr. Frank Blattner für die Zusammenarbeit bei den phylogenetischen Analysen.

Dr. Annegret Tewes für die Hilfe bei der Anzucht der Pflanzen.

Bei allen „CSF-lern“ möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die große Kollegialität bedanken.

Außerdem gilt mein uneingeschränkter Dank auch allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institut für die gute Zusammenarbeit.

Dr. Silke Peterek und Doreen Floß danke ich herzlich für ihre wertvolle Unterstützung und Hilfe in der Endphase.

Frank Holler danke ich herzlich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, insbesondere meinem Mann Dieter und meinen Kindern Linda, Lennard und Georg für ihre Unterstützung, ihre Rücksicht und ihr Verständnis während dieser Zeit.

Das Projekt wurde vom Land Sachsen-Anhalt gefördert.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Ich erkläre, dass ich die Arbeit erstmalig und nur an der Humboldt-Universität eingereicht habe.

Gatersleben, den 08. März 2007

.....  
Sylvia Marschner